

République Algérienne Démocratique et Populaire

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire**

N° d'ordre : 51/DS/2020
Série : 01/EV/2020

THÈSE

**Présentée pour l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences
Spécialité: Biochimie Appliquée**

Par : MOKRANI El Hassen

**Identification par criblage virtuel et analyses biologiques de
nouveaux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase pour le traitement
de la maladie d'Alzheimer.**

Soutenue publiquement le :18-10-2020

Devant le jury :

Président : CHIKHI A.

Encadreur : BENSEGUENI A.

Examineurs :

NEGhra A.

DEMS M.A.E.

SOBHI W.

Pr. Univ. F. Mentouri /Constantine 1

Pr. Univ. F. Mentouri/ Constantine 1

M.C.A. Univ. Badji Mokhtar/Annaba

M.R.A. CRBt Constantine

M.C.A Univ. Ferhat abbas /Setif 1

Année universitaire : 2019 – 2020

République Algérienne Démocratique et Populaire

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire**

N° d'ordre : 51/DS/2020
Série : 01/EV/2020

THÈSE

**Présentée pour l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences
Spécialité: Biochimie Appliquée**

Par : MOKRANI El Hassen

**Identification par criblage virtuel et analyses biologiques de
nouveaux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase pour le traitement
de la maladie d'Alzheimer.**

Soutenue publiquement le :18-10-2020

Devant le jury :

Président : CHIKHI A.

Encadreur : BENSEGUENI A.

Examineurs :

NEGhra A.

DEMS M.A.E.

SOBHI W.

Pr. Univ. F. Mentouri /Constantine 1

Pr. Univ. F. Mentouri/ Constantine 1

M.C.A. Univ. Badji Mokhtar/Annaba

M.R.A. CRBt Constantine

M.C.A Univ. Ferhat abbas /Setif 1

Année universitaire : 2019 – 2020

Cette thèse est la concrétisation de huit années d'étude et le fruit d'une collaboration fructueuse entre le laboratoire de Biochimie Appliquée à l'Université Frères Mentouri Constantine 1, Le Centre National de Recherche en Biotechnologie Constantine et l'équipe de modélisation moléculaire U1196-UMR 9187 de l'institut Curie-Centre de Recherche à l'Université Paris-Sud. Ainsi, je ne peux que remercier tous ceux qui étaient à mes côtés au cours de cette expérience.

*Je tiens à remercier chaleureusement, en tout premier lieu, mon directeur de thèse le Professeur **Abderrahmane BENSEGUENI** pour m'avoir initiée au monde de la modélisation moléculaire. Je vous remercie également pour vos conseils précieux, votre soutien et votre aide tout au long de ces années d'étude, et tout particulièrement durant les derniers moments de la thèse. Travailler avec vous à été une expérience vraiment enrichissante dans la mesure où vous parvenez à diriger efficacement mes recherches en me permettant de développer un sens et un goût de l'autonomie et de la rigueur scientifique. Vous m'avez permis de m'épanouir en me laissant la liberté d'agir, tout en gardant un œil bienveillant sur ma progression.*

*C'est avec un grand plaisir que je remercie le professeur **Abdelouahab CHIKHI** pour l'honneur qu'il me fait en présidant le jury de cette thèse ainsi que pour l'aide qu'il m'a accordé tout au long de ces années d'études.*

*J'exprime toute ma gratitude aux membres du jury, Monsieur **NEGHRA A**, Maitre de Conférences A hospitalo-universitaire à la faculté de médecine, Université Badji Mokhtar Annaba, Madame **SOBHI W**, Maitre de Conférences A, Université Ferhat Abbas Setif 1 et Monsieur **DEMS M.A.E** Maitre de Recherche A au Centre National de Recherche en Biotechnologie Constantine pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture et à l'évaluation de cette thèse.*

*Un immense remerciement est adressé à Mme **Liliane MOUAWAD** pour m'avoir ouvert les portes de son équipe de modélisation moléculaire à l'institut Curie à Paris. Je n'oublierai jamais le soutien et la confiance que vous m'avez témoignée dès mon arrivée en*

France. Vous avez mis à ma disposition un cadre de travail idéal à tous points de vue, vous avez toujours été disponibles pour moi, vous m'avez soutenu poussé à donner le meilleur de moi-même. Votre bienveillance, votre excellence et votre patience resteront un souvenir fort et un modèle pour le reste de ma vie. J'adresse également tous mes remerciements au docteur **Ludovic CHAPUT** pour ses conseils scientifiques, sa patience, son écoute et sa forte implication dans la réalisation de la partie « criblage virtuel » de cette thèse. J'ai énormément appris à son contact, et je lui en suis réellement reconnaissant. Mes vifs remerciements vont également à Mme **Claire BEAUVINEAU**, le responsable de la chimiothèque de Curie, pour sa gentillesse, ses conseils, sa rigueur scientifique et son aide précieuse lors de la rédaction de l'article. Je lui remercie également pour sa générosité en me procurant aussi facilement les composés à tester expérimentalement. Qu'elle soit assurée de ma gratitude.

Je tiens également à remercier chaleureusement les équipes des laboratoires 2 et 12 du Centre National de Recherche en Biotechnologie Constantine, particulièrement Monsieur **Chawki BENSOUICI**, pour son aide précieuse pendant la réalisation des tests *in vitro*.

Ma profonde reconnaissance va également aux responsables de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri Constantine 1, pour m'avoir accordé un stage de courte durée afin de finaliser les travaux de ma thèse dans de bonnes conditions.

Enfin, que tous ceux qui m'ont accordé un soutien, une aide technique ou un conseil, trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance. Ce travail ne serait pas ce qu'il est sans votre participation.

Du fond de mon cœur et avec l'intensité de mes émotions, Je dédie ce travail :

*À la mémoire de **ma mère** qui a toujours été là pour moi, et qui m'a donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. Sa prière et sa Bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie. Quoique je puisse dire et écrire, je ne pourrais exprimer ma grande affection et ma profonde reconnaissance. Qu'Allah*

l'accueille dans son vaste paradis.

*À **mon père**, celui qui a été le meilleur guide durant le long chemin de ma vie, celui qui m'a appris le travail et le bon comportement, j'espère te rendre fière par cette réussite.*

*À ma chère épouse **Asma**, Aucune dédicace, aussi expressive qu'elle soit, ne saurait exprimer la profondeur de mes sentiments, l'estime et le respect que j'ai pour toi. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'épauler. Tu me voulais toujours le meilleur. Tu as partagé avec moi les meilleurs moments de ma vie, aux moments les plus difficiles de ma vie, tu étais toujours à mes côtés, Je te remercie de ne m'avoir jamais déçu. Je ne te dis pas assez la chance que j'ai de t'avoir, mais je le sais, chaque jour. Je remercie le bon dieu qui a croisé nos chemins.*

*À mes adorables fils **Mohamed Ayoub** et **Anes**, Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut... Tous les mots ne sauraient exprimer mon amour pour vous... Bref, vous êtes la joie de ma vie. J'espère que ma thèse sera pour vous une source de fierté et qu'elle sera un exemple à suivre. Vos sourires ont été pour moi le meilleur encouragement que je puisse avoir. Que Dieu vous garde et vous protège.*

À Mon frère et son épouse, mes sœurs, leur époux et leurs enfants, pour leur amour et leurs encouragements. Je vous formule les plus sincères vœux de bonheur et d'un avenir radieux.

À mon beau père, belle mère, beaux frères et sœur, ceux qui m'ont encouragé et soutenu aux moments les plus difficiles.

À mes amis les plus fidèles seif, choaibe, qu'ils trouvent ici ma profonde reconnaissance et mon amitié.

À tous mes enseignants et mes collègues au département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire, particulièrement Brahim et Nabil. Ce fut un honneur et un plaisir de vivre cette période de ma vie avec vous.

Et pour finir, je présente d'avance mes excuses à ceux dont j'aurais oublié de citer le nom : ma mémoire peut me jouer de tours, mais ceci ne change rien à la considération que j'ai et que j'aurais toujours pour chacun de vous.

MOKRANI El Hassen

Introduction générale	01
Revue bibliographique	
Chapitre 1 : Maladie d'Alzheimer	
1. Introduction	04
2. Épidémiologie	05
3. Facteurs de risques	06
3.1. Age	06
3.2. Sexe.....	06
3.3. Facteurs génétiques	06
4. Traitement pharmacologique	07
4.1. Les antiglutamates	07
4.2. Les inhibiteurs des cholinestérasés	08
4.2.1. Tacrine	08
4.2.2. Donépézil	09
4.2.3. Rivastigmine	10
4.2.4. Galantamine	10
Chapitre 2 : Acétylcholinestérase	
1. Hypothèse cholinergique et implication des cholinestérasés dans la MA	12
2. Rôle physiologique des cholinestérasés	13
2.1. Acétylcholinestérase	13
2.2. Butyrylcholinestérase	14
3. Organisation structurale liée à la fonction des cholinestérasés	15
3.1. Structure tridimensionnelle de l'AChE	15
3.2. Site actif de l'AChE	16
3.2.1. Le site catalytique de l'AChE (CAS)	16
3.2.2. Le site périphérique de l'AChE (PAS)	18
4. Mécanisme d'hydrolyse de l'acétylcholine	19
Chapitre 3 : Criblage virtuel	
1. Processus de conception d'un nouveau médicament	21
1.1. Identification d'une cible thérapeutique	21
1.2. Identification des touches (hits)	22
1.3. Génération et optimisation des <i>leads</i>	22
1.4. Tests pré-cliniques	23
1.5. Essais cliniques	23
2. Criblage virtuel : méthode alternatives pour la découverte de médicaments	24

2.1. Outils du criblage virtuel	25
2.1.1. Cible	25
2.1.2. Chimiothèques	27
2.1.3. Programmes	28
2.2. Docking rigide, semi flexible et flexible	29
2.3. Algorithmes de recherches	29
2.3.1. Algorithmes de recherche systématique	30
2.3.2. Algorithmes de recherche stochastique	30
2.3.3. Algorithmes de recherche déterministe	30
2.4. Les différentes stratégies du criblage virtuel	30
2.4.1. Criblage virtuel « <i>Structure-Based</i> »	31
2.4.2. Criblage virtuel « <i>Ligand-Based</i> »	32
3. Évaluation des méthodes de criblage virtuel	32
3.1. Précision du positionnement	33
3.2. Enrichissement	33
4. Consensus scoring	34
5. Succès du criblage virtuel	35

Partie pratique

Matériel et méthodes

1. Criblage virtuel	39
1.1. Préparation de la cible	39
1.1.1. Choix de la structure cristallographique	39
1.1.2. Adaptation du fichier de l'enzyme au criblage virtuel	41
1.1.3. Définition de la cavité catalytique de l'enzyme.....	42
1.2. Préparation de la chimiothèque	43
1.2.1. Nettoyage de la chimiothèque	43
1.2.2. Enrichissement de la chimiothèque	44
1.2.3. Génération des tautomères, formes ionisées et optimisation de la géométrie.	44
1.3. Protocole du criblage virtuel « <i>Structure-Based</i> »	45
1.3.1. Glide version 6.3	45
1.3.2. Gold version 5.2.2	46
1.3.3. Surflex version 2.745	46
1.3.4. FlexX version 2.1.5	48
1.4. Traitement des fichiers de sortie (<i>output</i>)	49

1.5. La méthode dite <i>variable Standard Deviation Consensus</i> (vSDC).....	50
1.6. Inspection visuelle et sélection des composés à expérimenter.....	50
2. Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité Anti-AChE	51
3. Recherche des analogues structuraux	54
4. Prédiction des propriétés ADMET.....	54
4.1. Propriétés physicochimiques	55
4.1.1. Règle de Lipinski	55
4.1.2. Règle Veber	55
4.1.3. Solubilité dans l'eau	55
4.1.4. Accessibilité à la synthèse	56
4.2. Propriétés pharmacocinétiques	56
4.2.1. Inhibition des Cytochromes P450	56
4.2.2. Absorption gastro-intestinale	57
4.2.3. Perméabilité des lignées coca-2	57
4.2.4. Perméabilité hémato-encéphalique	57
4.3. Toxicité potentielle	57
4.3.1. Le test d'Ames	58
4.3.2. Le test d'inhibition du gène hERG	58
4.3.3. Le test de cancérogénicité	58
4.3.4. Le test de toxicité potentielle aigüe	58
5. Evaluation <i>in vivo</i> de la toxicité aigüe des hits	59
5.1. Préparation des <i>Artémia</i>	59
5.2. Préparation des composés.....	59
5.3. Protocole du test de cytotoxicité.....	59
5.4. Evaluation du pourcentage de mortalité des larves.....	60

Résultats et discussion

1. Validation du protocole de criblage virtuel	61
1.1. Evaluation de la performance des programmes de criblage virtuel	61
1.2. Apport de la méthode dite <i>variable Standard Deviation Consensus</i>	63
1.3. Sélection par analyse visuelle des molécules potentiellement actives	65
2. Evaluation expérimentale de l'activité anti-AChE des molécules potentiellement actives	67
2.1. Détermination du pourcentage d'inhibition.....	67
2.2. Détermination de l'IC ₅₀	68
3. Etude du mode d'interaction des hits 11288 et 10758	70

4. Etude de la similarité structurale.....	75
4.1. Les analogues structuraux des hits 11288 et 10758	75
4.2. Evaluation expérimentale de l'activité anti-AChE des analogues structuraux	76
5. Évaluation qualitative et quantitative du criblage virtuel par vSDC.....	79
6. Relation structure-activité	82
6.1. Etude comparative des modes d'interaction avec l'AChE du hit 11288 et de son analogue structural 11261	82
6.2. Etude comparative des modes d'interaction avec l'AChE du hit 10758 et de ses analogues structuraux 2 , 5 et 3033	84
6.3. Comparaison du mode d'interaction de la galantamine et des analogues structuraux 11261 , 2 , 5 et 3033	90
7. Prédiction des propriétés ADMET	91
7.1. Propriétés physico-chimiques	92
7.2. Propriétés pharmacocinétiques.....	93
7.3. Toxicité potentielle.....	94
8. Evaluation <i>in vivo</i> de la toxicité aigüe sur les larves d' <i>Artemia salina</i>	96
9. Evaluation du rapport CL ₅₀ /IC ₅₀	99
Conclusion et perspectives	101
Références bibliographiques	
Travaux scientifiques	
Annexes	
Résumés	

3D : Tridimensionnelle.

ACh : Acétylcholine

AChE : Acétylcholinestérase

ADMET : Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination et Toxicité

AGI : Absorption Gastro-Intestinale

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché.

ATCI : Acétylcholine-iodide

BCh : Butyrylcholine

BChE : Butyrylcholinestérase

CaCo-2 : Carcinome colorectal humain 2

CAS : Site catalytique

ChE : Cholinestérase

CL₅₀ : Concentration létale 50

CYP : Cytochrome P450.

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DTNB: Acide 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoïque)

DUD-E: Directory of Useful Decoys Enhanced

HCV : *Hepatitis C Virus*

hERG : *Human Ether-à-go-go-Related Gene*

I : Inhibition

I% : Pourcentage d'inhibition

IC₅₀ : *50% inhibitory concentration* (Concentration Inhibitrice 50)

kDa : kilo dalton

K_{cat} : Constante catalytique

K_m : Constante de Michaelis

Log P : Coefficient de partage Octanol/Eau

MA : Maladie d'Alzheimer

NCBI : *National Center for Biotechnology Information*

nLF : Nombre de liaisons flexibles

NMDA: N-methyl-D-aspartic acid

nOHNO : Nombre de donneurs de liaison hydrogène

nON : Nombre d'accepteur de liaison hydrogène

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

P : Perméabilité

PAS : Site périphérique

PDB : *Protein Data Bank*

PHE : Perméabilité Hémato-Encéphalique

PM : Poids moléculaire

QSAR : *Quantitative structure-activity relationship*

SBVS: *Structure Based virtuel screening*

SCh: Thiocholine

RMSD: *Root Mean Square Deviation*

RSA: Relation Structure-Activité

RSCB: *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics*

TNB : 5-thio-2-nitrobenzoate

TPSA : l'aire de la surface polaire

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

vSDC : *variable Standard Deviation Consensus*

Figure 1. Marqueurs histologiques de la MA.	05
Figure 2. Structure chimique de la mémantine.	08
Figure 3. Structure chimique de la tacrine	09
Figure 4. Structure chimique de la donépézil	09
Figure 5. Structure chimique de la rivastigmine.	10
Figure 6. Structure chimique de la galantamine	11
Figure 7. Représentation schématique du mécanisme de neurotransmission cholinergique.	12
Figure 8. Structures tertiaire d'un monomère de la AChE humaine (Code PDB : 4B41).	16
Figure 9. Site actif de l'AChE (code PDB : 4M0E). La structure secondaire de l'enzyme est représentée par des « cartoons » gris. Les surfaces du CAS et du PAS sont représentées en bleu foncé et rouge respectivement.	17
Figure 10. Site actif de l'AChE humain (code PDB : 4EY7).	18
Figure 11. Structure tridimensionnelle de l'AChE humaine (code PDB : 4EY7).	19
Figure 12. Cycle catalytique de l'hydrolyse de l'Acétylcholine	20
Figure 13 Evolution du nombre de publications de 1997 à 2015 dans la base de données <i>PubMed</i> en utilisant comme mot clés « <i>virtual screening</i> ».	25
Figure 14. Evolution du nombre de structures disponibles dans la PDB depuis sa création jusqu'à 2018 (en bleu: nombre de nouvelles structures par an, en rouge: nombre total de structures cumulées).	26
Figure 15. Fréquence de citation des logiciels de docking moléculaire entre 1990 et 2013 dans la base de données <i>PubMed</i> .	29
Figure 16. Représentation schématique des étapes de l'approche « conception <i>de novo</i> ».	32
Figure 17. Courbe d'enrichissement (noir) représentent l'évolution du taux des actifs en fonction du taux de sortie de la chimiothèque totale. Une classification aléatoire des composés de la chimiothèque est représentée par une diagonale bleue allant du point (0,0) au point (1,1) du graphique (<i>Random</i>)	34
Figure 18. Structure chimique du gefitinib	38
Figure 19. Alignement des résidus de la cavité catalytique des 6 structures cristallographiques de l'AChE humaine. (4M0E en bleu, 4M0F en rouge, 5HFA en jaune, 5HF9 en vert, 5HF6	40

en gris et **5HF5** en mauve).

- Figure 20.** Structure des ligands existants dans le complexe 4M0E de l'enzyme AChE. (a) dihydrotanshinone I, (b) alpha-l-fucose, (c) 1,2-éthanediol, (d) ions nitrates et (e) N-acétyl-D-glucosamine. **41**
- Figure 21.** Préparation de la triade catalytique de l'AChE. **42**
- Figure 22.** Vue de face (à gauche) et de profil (à droite) de la structure cristallographique de l'AChE humaine (code PDB : **4M0E**) en complexe avec son inhibiteur (**1YL**). La structure secondaire de l'enzyme est représentée en mode « cartoon » en gris tandis que le CAS (en bleu) et le PAS (en rouge) sont représentés en mode « surface ». **43**
- Figure 23.** Exemple de la variation de l'état chimique des molécules : (a) formes tautomères (transfert intramoléculaire de proton) ; (b) états d'ionisation (perte de proton) **44**
- Figure 24.** Positionnement de la boîte 3D ou « GridBox » dans le site actif de l'AChE (Code PDB : **4M0E**). **46**
- Figure 25.** Représentation du *Protomol* représenté par types d'atomes en mode « Lines » dans le site actif de l'AChE représenté en gris en mode « Surf ». **47**
- Figure 26.** Réaction colorimétrique d'Ellman. **52**
- Figure 27.** Courbes d'enrichissements des programmes Surfex (vert), Glide (rouge), Gold (bleu) et FlexX (violet) évoquant le classement des molécules actives. La droite (bleu ciel) correspond au classement aléatoire ou *Random*. **62**
- Figure 28.** Représentation graphique montrant le degré de corrélation des scores générés par Surfex et Gold (a), Surfex et Glide (b), et Gold et Glide (c). **64**
- Figure 29.** Comparaison des courbes d'enrichissement des programmes vSDC (rouge), Surfex (bleu), Gold (violet), Glide (vert) et le *Random* (droite bleu ciel). **65**
- Figure 30.** Structure moléculaire des composés avec leur identifiant sélectionnées par l'analyse visuelle. **66**
- Figure 31.** Courbes dose-réponse de la galantamine et des huit hits identifiés. **69**
- Figure 32.** Mode de positionnement des hits **11288**, **10758** et de la galantamine dans la cavité catalytique de l'AChE. Le CAS est représenté en mode surface bleu et le PAS en mode surface rouge. **71**
- Figure 33.** Mode d'interaction des hits **11288**, **10758** et la galantamine dans la cavité catalytique de l'AChE. Les liaisons hydrogène sont représentées en mauve, les interactions π -cation en rouge, les interactions π - π en vert et les interactions ioniques en mauve et rouge. Le **73**

cercle gris indique le contact avec l'eau.

- Figure 34.** Structure chimique de **11288** et son analogue **11261** (à gauche), et de **10758** et ses analogues **5**, **3033** et **2** (à droite). **76**
- Figure 35.** Courbes dose-réponse des quatre analogues structuraux. **78**
- Figure 36.** Classements des hits par vSDC (bleu), Glide (vert), Gold (rouge) et Surflex (noir) en fonction de leurs IC₅₀ expérimentales. **80**
- Figure 37.** Structures et modes de positionnement du hit **11288** et de son analogue structural **11261** dans les sites PAS (en rouge) et CAS (en bleu) de la cavité catalytique de l'AChE. **83**
- Figure 38.** Mode d'interaction de l'analogue **11261** dans le site PAS de l'AChE. Les interactions sont représentées avec les mêmes couleurs que dans la figure 33. **83**
- Figure 39.** Structures et modes de positionnement dans le site actif de l'AChE du hit **10758** et de ses trois analogues structuraux **2**, **5** et **3033** **86**
- Figure 40.** Modes d'interactions des trois analogues structuraux **5** (a), **3033** (b) et **2** (c) avec le site actif de l'AChE. **87**
- Figure 41.** Courbes dose-réponse des hits étudiés montrant l'évolution du pourcentage de mortalité des larves d'*Artemia salina*. **97**

Tableau 1. Quelques exemples de médicaments mis sur le marché pour lesquels la mise en œuvre de criblages virtuels à joué un rôle important.	35
Tableau 2. Principales caractéristiques des complexes AChE humaine-inhibiteur issus de la PDB.	40
Tableau 3. Evaluation de la performance des programmes de docking moléculaire Gold, Glide, Surflex et FlexX en fonction du taux de sortie des inhibiteurs connus de la DUD-E dans les premières portions du classement.	61
Tableau 4. Classement par Glide, Gold et Surflex de quelques inhibiteurs de l'AChE	63
Tableau 5. Pourcentage d'inhibition de l'AChE à la concentration de 100 μ M des dix composés étudiés	67
Tableau 6. Evaluation des pourcentages d'inhibition des hits à différentes concentrations	68
Tableau 7. Valeurs des IC ₅₀ de la galantamine et des hits identifiés.	69
Tableau 8. Récapitulatif des interactions impliquées dans le site actif de l'AChE par la galantamine et les deux hits 11288 et 10758 .	74
Tableau 9. Valeurs du pourcentage d'inhibition à 100 μ M des quatre analogues structuraux.	77
Tableau 10. Evaluation du pourcentage d'inhibition des quatre analogues structuraux à différentes concentrations.	78
Tableau 11. Valeurs des IC ₅₀ des quatre analogues structuraux.	79
Tableau 12 Comparaison des classements des hits par les programmes vSDC, Glide, GOLD et Surflex	81
Tableau 13. Récapitulatif des interactions impliquées dans le site actif de l'AChE par le hit 11288 et son analogue structural 11261 .	84
Tableau 14 Récapitulatif des interactions impliquées dans le site actif de l'AChE par le hit 10758 et ses trois analogues structuraux 2 , 5 et 3033 .	88

Tableau 15. Récapitulatif des interactions impliquées dans le site actif de l’AChE par la galantamine, le hit 11288 et son analogue structural 11261	91
Tableau 16 Propriétés physicochimiques des hits 11288, 10758, 11261, 5, 3033, 2 et de la galantamine.	92
Tableau 17. Caractéristiques pharmacocinétiques des hits 11288, 10758, 11261, 2, 5, 3033 et de la galantamine.	93
Tableau 18. Toxicité potentielle des hits 11288, 10758, 11261, 2, 5,3033 et de la galantamine.	95
Tableau 19. Taux de mortalité des larves d’ <i>Artemia salina</i> exprimé en CL ₅₀ .	96
Tableau 20. Evaluation du rapport CL ₅₀ /IC ₅₀ des hits 11288, 11261, 10758, 5, 3033, 2 en comparaison avec la galantamine.	99

Équation 1. Formule du RMSD entre deux composés A et B.	33
Équation 2. Fonction de score du programme FlexX	49
Équation 3. Mode de calcul du pourcentage d'inhibition.	53
Équation 4. Calcul du pourcentage de mortalité des larves	60

Annexe 1. Contenu des fichiers comportant la liste des résidus du site actif de l'ACHé.

Annexe 2. Paramètres par défaut de l'algorithme génétique de Gold.

Annexe 3. Quelques lignes du fichier comportant la première liste des composés de la chimiothèque à cribler virtuellement par Surfex. Le chemin vers le fichier (.sdf) relative à chaque composé doit figurer dans cette liste.

Annexe 4. Les paramètres contrôlant la sélection et l'emplacement des fragments appliqués selon la configuration par défaut du programme FlexX.

Annexe 5. Extrait du fichier *output* résultant du criblage virtuel par Surfex avant traitement informatique. Dans cette partie, les 20 poses du composé 10 sont représentées par 3 valeurs dont la première correspond au score qui nous intéresse ici.

Annexe 6. Extrait du fichier obtenu après traitement informatique du fichier *output* résultant du criblage virtuel par Surfex. Dans ce fichier, les molécules de la chimiothèque avec leur code (deuxième colonne) sont classées en fonction de leur score par ordre décroissant (première colonne).

Annexe 7. Extrait du fichier *input* de lancement de vSDC.

Annexe 8. Extrait du fichier *output* de vSDC tenant compte des tautomères et des molécules actives de la DUD-E. Le nom des molécules actives commence par ChEMBL. Les tautomères issues d'une même molécule sont représentées avec la même couleur.

Annexe 9. Contenu du fichier *output* de vSDC en présence des molécules actives de la DUD-E. Les six colonnes représentent respectivement : le classement, le score vSDC, le nom de chaque composé (celui des molécules actives commence par ChEMBL), les scores de Glide, Surfex et Gold.

Annexe 10. Contenu du fichier vSDC après traitement en absence des molécules actives de la DUD-E. Les tautomères de chaque composé (si existant) ont été éliminés pour ne garder que celui le mieux classé. Ce fichier comporte six colonnes représentant respectivement : le classement, le score vSDC, le nom de chaque composé, le score de Glide, Surfex et Gold.

Annexe 11. Superposition des résidus du site actif de l'ACHé humaine en jaune (code pdb : 4M0E) et ceux de l'espèce *Electrophorus electricus* en bleu (code pdb : 1C2B).

Introduction générale

La maladie d'Alzheimer (MA) est définie comme étant une maladie neuro-dégénérative entraînant la perte progressive et irréversible des fonctions mentales, notamment la mémoire et le raisonnement (Høgh, P. 2017). Cent ans après sa découverte par un médecin allemand dont elle porte le nom, la MA est devenue un vrai problème de santé publique car elle touche près de 47, 5 millions de personnes à travers le monde. D'ici à 2050, ce seront plus de 130 millions si rien n'est fait pour lutter contre cette maladie. En Algérie, plus de 200 000 personnes sont atteintes par l'Alzheimer. Ces chiffres alarmants sont parmi les raisons majeures qui ont suscité notre intérêt pour la MA à laquelle nous voudrions apporter notre modeste contribution, dans le cadre de ce travail de recherche (Niu, H. et al 2017).

L'autre raison majeure qui a également motivé notre intérêt est l'absence à nos jours de traitement curatif de la MA ; seules des stratégies destinées à atténuer les symptômes de l'Alzheimer sont proposées. D'où tout l'intérêt d'aller vers la mise au point d'une thérapie efficace passant par l'identification d'une cible thérapeutique potentielle non encore ou mal exploitée. À ce titre, l'acétylcholinestérase (AChE) semble tout indiquée car peu de travaux ont été dédiés à cette enzyme pour laquelle on ne connaît, à l'heure actuelle, que quatre inhibiteurs: la tacrine (Summers, W.K. et al 1986), la donépézil (Rogers, S.L. et al 1997), la rivastigmine (Polinsky, R.J. 1998) et la galantamine (Maelicke, A. et al 2001). Bien qu'étant efficaces, les grandes agences de santé, en France par exemple, ne recommandent plus l'utilisation de ces inhibiteurs pour traiter la MA, car présentant beaucoup d'effets indésirables (nausées, vomissement, éruptions cutanées etc....) que ne peuvent supporter les personnes âgées (Von Gunten, A. et al 2000).

L'AChE est une enzyme présente notamment dans le tissu neuronal assurant la régulation de l'influx nerveux en dégradant l'acétylcholine (ACh) issue d'une neurotransmission (Urbain, A. 2007). Dans les stades sévères de la maladie, le déficit en ACh peut atteindre jusqu'à 90%, ce qui explique les troubles cognitifs observés tels que la perte de mémoire, les troubles du langage, la désorientation ou encore les changements d'humeur. L'inhibition de l'AChE permettra d'augmenter le taux d'ACh dans le cerveau et de diminuer sa dégradation (Mehta, D. et al 2017).

C'est sur la base de ce constat que repose cette étude, dédiée à la recherche et l'identification de nouveaux inhibiteurs de l'AChE, avec d'autres mécanismes d'action et moins d'effets toxiques, en mettant en œuvre deux méthodes complémentaires :

- La première *in silico* consiste à identifier les molécules potentiellement actives par criblage virtuel d'une chimiothèque de plusieurs milliers de molécules et à prédire leurs propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques ainsi que leur toxicité potentielle.

- La deuxième expérimentale consiste à évaluer et à vérifier l'activité et la toxicité *in vitro* et *in vivo* des molécules identifiées plus haut.

Par le passé, l'activité des molécules est d'abord testée *in vitro* afin d'identifier celles prometteuses capables d'être ensuite optimisées et testés *in vivo* ; c'est ce qu'on appelle le criblage à haut débit. Les nombreux problèmes d'ordre scientifique, technique, méthodologique, financier et organisationnel auxquels a été confrontée cette méthodologie a encouragé le développement de nouvelles approches telles que le criblage virtuel (Elkaïm, J. 2011). Cette dernière consiste à prédire l'affinité d'un très grand nombre de ligands d'une chimiothèque donnée pour le site actif d'une cible thérapeutique potentielle considérée afin d'aboutir à une liste très réduite de molécules avec l'activité souhaitée. Seules, ces molécules seront testées expérimentalement. Etant plus facile et moins coûteuse que les criblages expérimentaux, cette démarche s'est développée pour devenir, de nos jours, un outil incontournable qu'utilisent de plus en plus les compagnies pharmaceutiques pour la recherche et la découverte de nouvelles molécules bioactives (Arrault, A. 2007). Cependant, le rendement obtenu à ce jour par criblage virtuel est généralement faible, en deçà de 20 %, nécessitant de tester expérimentalement plusieurs dizaines voire des centaines de molécules pour aboutir finalement à quelques-unes seulement qui s'avéreront actives (Di Giovanni, C. et al 2016, Liu, M. et al 2017).

Pour pallier ce problème et augmenter nos chances d'identifier efficacement par criblage virtuel de nouveaux inhibiteurs de l'AChE, nous avons jugé utile de faire appel non plus à un seul programme de docking moléculaire comme c'est le cas dans les études citées plus haut mais à plusieurs et différents programmes de docking moléculaire et d'y associer une méthode consensus dite « variable Standard Deviation Consensus » (vSDC) (Chaput, L. et al 2016)

Au-delà de l'objectif principal qui vise l'identification de nouvelles molécules actives sur l'AChE, l'étude aura aussi pour but d'évaluer la fiabilité des méthodes de criblage virtuel

dans la recherche de ces molécules et de mieux appréhender leurs mécanismes d'action avec l'enzyme par analyse de la relation structure-activité.

Le premier chapitre du présent travail sera consacré à la MA. Nous retracerons brièvement son histoire, son épidémiologie et détaillerons les principaux facteurs de risques liés à cette maladie. L'accent sera également mis sur différentes approches thérapeutiques actuellement préconisées pour le traitement de la MA dont les antiglutamates et les inhibiteurs de l'AChE qui nous intéressent dans cette étude.

Dans le deuxième chapitre, nous nous intéresserons à l'AChE en détaillant son rôle physiologique et son implication dans la MA. Une bonne partie de ce chapitre sera consacré aux données structurales de l'enzyme notamment son site actif et son mécanisme d'action.

Dans le troisième chapitre, nous aborderons les différentes approches par criblage virtuel et leur implication dans le processus du *drug design*. Nous citerons particulièrement les outils nécessaires à la réalisation d'un criblage virtuel ainsi que les diverses méthodes d'évaluation de sa fiabilité.

Dans un quatrième chapitre seront évoqués les différentes méthodes et matériels utilisés dans ce travail.

L'essentiel de nos résultats, leurs interprétations et leurs discussions seront exposés dans un dernier chapitre.

Une conclusion et perspectives clôtureront ce manuscrit.

Revue
Bibliographique

Chapitre 1 :

Maladie d'Alzheimer

1. Introduction

L'Alzheimer est une maladie neuro-dégénérative et démentielle touchant notamment les personnes âgées. La première description de cette maladie est l'œuvre du neuropsychiatre allemand Aloïs Alzheimer qui, en 1906, constate des troubles spécifiques chez une femme de 51 ans (Augusta D) hospitalisée à l'hôpital de Francfort (Alzheimer, A. 1907). Sur un plan clinique, il s'agit d'une pathologie évolutive s'exprimant par une dégénérescence graduelle et irréversible des fonctions intellectuelles telles que la mémoire, l'orientation, le jugement, le langage, et la capacité à acquérir de nouvelles connaissances conduisant ainsi à un état de démence (Alzheimer, A. 1911).

Au début des années 60, la recherche sur la MA a pris son véritable essor avec l'émergence de nouveaux outils de recherche tels que le microscope électronique ou les différentes méthodes d'analyses histologiques et biochimiques. En effet, lors de la MA, les neurones sont affectés par deux types de lésions : les plaques amyloïdes (peptide b-amyloïde) que l'on retrouve entre les neurones (Patry-Morel, C. 2006), et la dégénérescence neurofibrillaire (protéine tau, anormalement phosphorylées) que l'on retrouve à l'intérieur des neurones (Delacourte, A. et al 1990). Ces deux lésions correspondent à des amas de protéines qui se forment lors du processus normal du vieillissement. Cependant, dans les démences de type Alzheimer, ces protéines s'accumulent en beaucoup plus grande quantité constituant ainsi les marqueurs histologiques caractérisant cette maladie comme illustrés dans la figure 1 (Benckroun, M. 2014). Ces deux types de lésions ont pour conséquence la destruction neuronale en entraînant la perte progressive des fonctions cognitives et de l'intégrité intellectuelle (Lapre, E. 2012). Dès lors, les connaissances sur la genèse et le développement de la MA n'ont cessé d'évoluer et les chercheurs se sont penchés également sur l'aspect biochimique de la pathologie et principalement sur le rôle des neurotransmetteurs. Ils découvrent ainsi qu'un déficit en ACh pouvait accélérer le déclin cognitif (Jellinger, K.A. 2006, Eystache, F. et al 2015).

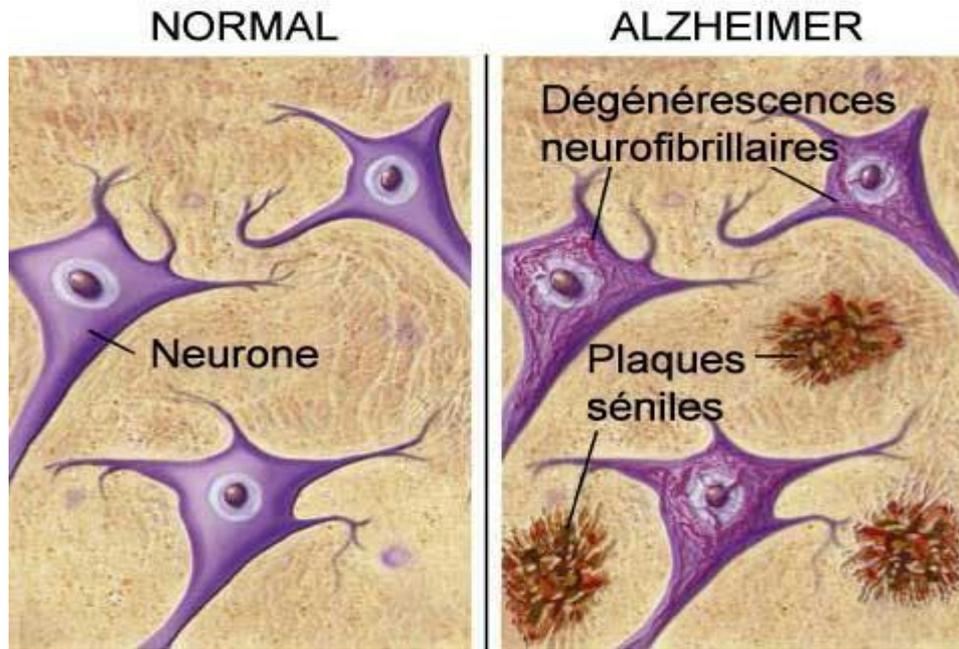


Figure 1. Marqueurs histologiques de la MA (Fondation pour la Recherche sur Alzheimer, 2019).

2. Epidémiologie

La MA est désormais en passe de devenir un véritable fléau qui ronge de plus en plus la santé des personnes âgées aux quatre coins du monde. Première cause de démence des sujets âgés, cette maladie est responsable de 75 % de l'ensemble des démences. Elle atteint 5 % de la population âgée de plus de 65 ans et 20 % des personnes de plus de 80 ans (Michael, J.M. et al 2007). En raison de l'augmentation de l'espérance de vie, le nombre de patients atteints par la MA ne fait que s'accroître dans le monde. Actuellement, plus de 47 millions de personnes dans le monde sont touchées par cette maladie avec 7.7 millions de nouveaux cas par an. Selon les prévisions de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le nombre de malades devrait presque doubler tous les 20 ans, pour passer à 131,5 millions en 2050 si rien n'est fait pour pallier la progression de cette maladie (Eystache, F. et al 2015, World Alzheimer Report, 2015).

Selon une statistique récente fournie par l'association monégasque pour la recherche sur la MA lors de la première conférence méditerranéenne sur la MA, plus de 200 000 algériens sont touchés par cette maladie. Ce nombre devra augmenter au fil des années pour atteindre les 500 000 d'ici 2050 en raison de l'allongement de l'espérance de vie et la baisse du taux de natalité. Financièrement parlant, l'état Algérien dépense environ un milliard de centime pour la prise en charge et le transfert d'un seul malade atteint d'Alzheimer à l'étranger. Son coût

global pour la société, déjà très élevé, ne devrait cesser de s'alourdir car sa prévalence croît d'une manière exponentielle avec l'âge (Rapport Alzheimer et méditerranée, 2016). Ces chiffres alarmants expliquent en partie les raisons ayant motivé notre choix d'étudier la MA dans le cadre de la réalisation de notre thèse de doctorat.

3. Facteurs de risques

En regard des publications scientifiques concernant la MA, plusieurs études épidémiologiques ont été menées en vue de définir les facteurs de risques pouvant expliquer l'apparition de cette maladie. Même si certaines pistes n'ont pas reçu les preuves empiriques suffisantes et manquent de crédibilité, certains facteurs comme l'âge, le sexe ou encore les facteurs génétiques sont fortement corrélés à cette maladie. L'association de ces facteurs construit peu à peu le terrain d'Alzheimer (Lapre, E. 2012).

3.1. Age

L'âge est le facteur de risque le plus évident et le plus évoqué dans les études épidémiologiques. Bien que cette neuropathologie ne s'inscrive pas dans le processus normal du vieillissement, la prévalence mondiale de la MA augmente de façon exponentielle avec l'avancée dans l'âge après 65 ans pour atteindre 30 % à 85 ans (World Alzheimer Report, 2015). Une étude épidémiologique récente portant sur des personnes âgées en Europe a montré que la prévalence des atteints de la MA augmente avec l'âge. Elle est de 0.97% chez les personnes âgées de 65 à 74 ans, de 7.66% chez les personnes âgées entre 75 et 84 ans, pour atteindre 22.53 % chez les âgés de plus de 85 ans (Niu, H. et al 2017).

3.2. Sexe

L'étude épidémiologique menée par Niu, H. et al 2017 montre également une différence entre les hommes et les femmes quant à la MA. En effet, deux fois plus de femmes que d'hommes ont la MA. Ceci est attribuable en grande partie aux changements hormonaux qui surviennent à la ménopause, particulièrement la diminution de l'œstrogène, une hormone importante (Niu, H. et al 2017).

3.3. Facteurs génétiques

Après l'âge, les antécédents familiaux de la MA représentent un des ses plus importants facteurs de risque. Le risque de développer la MA est ainsi deux fois plus élevé chez les sujets

apparentés au premier degré à des patients atteints de cette maladie comparé au risque en population générale (Chouraki, V. 2013). Afin d'établir une corrélation entre l'hérédité et la MA, une étude menée chez 11884 paires de jumeaux montre que l'héritabilité de cette maladie est estimée entre 58% et 79% (Gatz, M. et *al* 2006). Ces résultats sont en faveur d'une composante génétique importante de la MA.

4. Traitement pharmacologique

Dans l'état actuel des connaissances de la médecine, aucun traitement pharmacologique ne permet d'enrayer de façon définitive la MA, encore moins pour la prévenir. Il existe cependant des traitements symptomatiques permettant d'atténuer les troubles cognitifs, sans toutefois empêcher la progression de la maladie. Ces traitements peuvent améliorer la qualité de vie des atteints durant plusieurs années. Leur efficacité est très variable d'une personne à l'autre et les effets secondaires peuvent également être importants et intolérables par les personnes âgées. Deux classes de médicaments sont actuellement utilisés pour le traitement de la MA : les inhibiteurs des cholinestérases (ChE) et les antiglutamates (Urbain, A. 2007).

4.1. Les antiglutamates

Cette classe thérapeutique, apparue en 2002, ne contient qu'un seul médicament : la mémantine (Axura®, Ebixa®) (Parsons, C.G. et *al* 2007). Elle est prescrite pour les patients aux stades modéré et avancé de la maladie. Lors de l'évolution de l'Alzheimer, les neurones malades libèrent trop de glutamate (neurotransmetteur). Ce dernier va se lier aux récepteurs d'autres neurones pour les stimuler constamment, ce qui les affaiblit et finit par les mettre hors d'état de fonctionner (phénomène d'excitotoxicité). De plus, les neurones trop stimulés ne parviennent plus à reconnaître les signaux d'information et d'apprentissage normaux entraînant ainsi une diminution des performances du cerveau. La mémantine intervient dans ce processus en bloquant une partie des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) du glutamate: les neurones ainsi protégés reconnaissent à nouveau les signaux d'information et d'apprentissage normaux. Cette molécule a prouvée son effet de retarder la perte des fonctions cognitives liées à la MA allant parfois jusqu'à les améliorer chez certains patients. En limitant le phénomène d'excitotoxicité, la mémantine présente ainsi un effet neuroprotecteur ralentissant la progression de la maladie (Lipton, S.A. 2005; Bullock, R. 2006, Urbain, A. 2007).

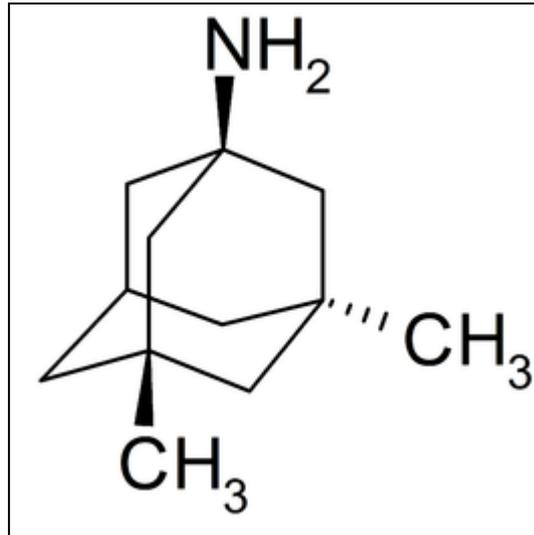


Figure 2. Structure chimique de la mémantine

4.2. Les inhibiteurs des cholinestérases

Lors de la MA, le système cholinergique est précocement atteint avec une synthèse du neurotransmetteur ACh anormalement basse. Les inhibiteurs des ChE sont les premiers médicaments ayant une action démontrée sur la MA. Ainsi, ils augmentent la quantité d'ACh dans la synapse, en bloquant sa dégradation par l'inhibition des enzymes responsables de sa dégradation : l'AChE notamment et la BChE (Grossberg, G.T. 2003, Recanatini, M. et *al* 2004).

4.2.1. Tacrine

En 1993, la tacrine (Cognex®) a été le premier traitement symptomatique de la MA mis sur le marché par la compagnie pharmaceutique Pfizer (Crismon, M.L. 1994 ; Davis, K.L, et *al* 1995). C'est un inhibiteur non compétitif de l'AChE mais aussi de la BChE. En dépit de son effet thérapeutique puissant, ce médicament a été retiré du marché français depuis 2004 à cause de ses nombreux effets secondaires (toxicité hépatique, troubles digestifs et cutanés) et d'une demi-vie courte qui nécessitait quatre prises par jour, ce qui est problématique pour des personnes souffrant de pertes de mémoire (Augry, F. et *al* 1997 ; Galisteo, M. et *al* 2000).

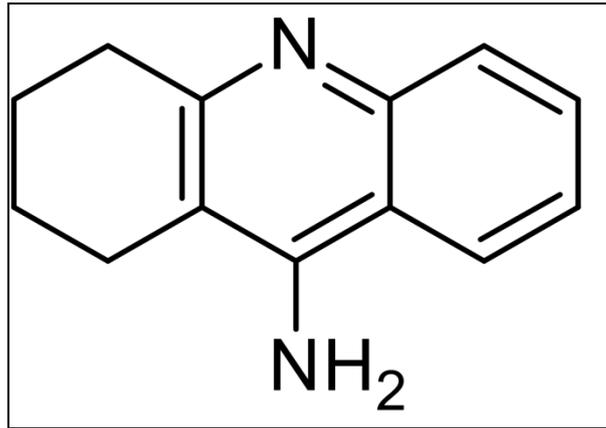


Figure 3. Structure chimique de la tacrine

4.2.2. Donépézil

La donépézil est le deuxième médicament de cette classe mis sur le marché en 1996 aux USA. Il s'agit d'un inhibiteur sélectif de l'AChE avec peu d'effet sur la BChE. C'est l'un des traitements anti-Alzheimer les plus couramment utilisés de nos jours car possédant une demi-vie plus longue que la tacrine, ce qui facilite considérablement la prise du traitement (Rogers, S.L. et *al* 1997). De plus, cette molécule interagit peu avec d'autres médicaments, ce qui permet de la combiner avec d'autres traitements tels que des psychotropes et des anti-parkinsoniens (Barner, E.L. et *al* 1998). Cependant, ses effets secondaires (nausée, diarrhée, céphalées, plus qu'une insomnie, des cauchemars, des vertiges ou des crampes musculaires) contraignent à l'arrêt du médicament (Von Gunten, A. et *al* 2000). Il est important de signaler que la donépézil est le seul inhibiteur de l'AChE disponible sur le marché Algérien jusqu'à présent (Rapport Alzheimer et méditerranée, 2016).

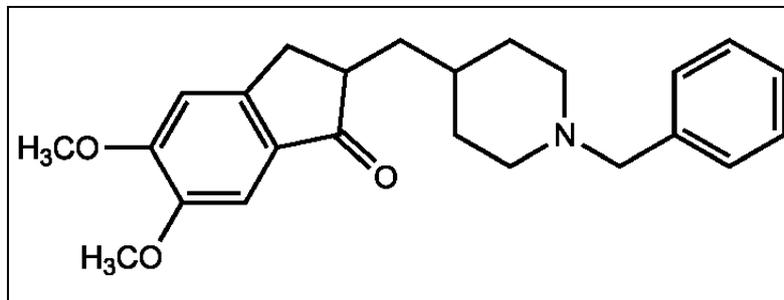


Figure 4. Structure chimique de la donépézil

4.2.3. Rivastigmine

Apparu sur le marché européen en 1998 pour le traitement symptomatique de la MA, la rivastigmine, dérivé de la physostigmine (alcaloïde naturel), est un inhibiteur réversible des ChE (Agid, Y. *et al* 1998; Spencer, C.M. *et al* 1998). Sa sélectivité pour la ChE cérébrale, sa faible toxicité ainsi que son métabolisme indépendant du système enzymatique hépatique permettent une action ciblée tout en limitant les interactions médicamenteuses (Polinsky, R.J. 1998). En dehors des effets secondaires gastro-intestinaux plus fréquents et une perte de poids qui peut survenir plus tardivement, le profil de la rivastigmine est comparable à celui de la donépézil. (Von Gunten, A. *et al* 2000)

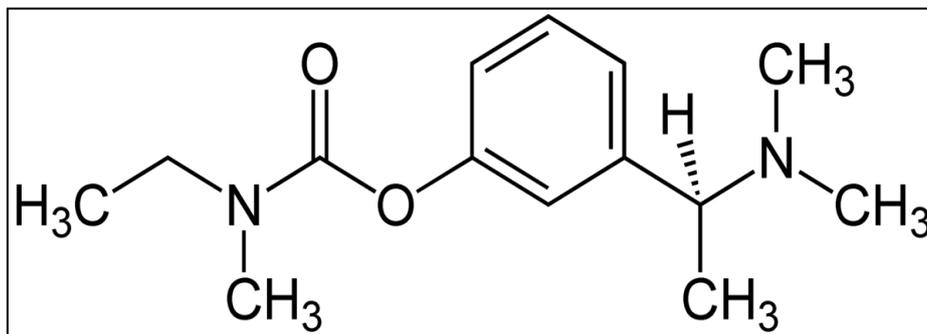


Figure 5. Structure chimique de la rivastigmine.

4.2.4. Galantamine

La galantamine (Reminyl®) est le dernier inhibiteur des ChE mis sur le marché depuis 2000. C'est un alcaloïde d'origine naturelle isolé de plusieurs plantes de la famille des Amaryllidacées comme le perce-neige (*Galanthus nivalis*) ou le narcisse (*Narcissus sp*) (Harvey, A.L. 1995). À la différence des précédents inhibiteurs, la galantamine présente un double mécanisme d'action : en plus d'inhiber de façon compétitive et réversible l'AChE et la BChE, elle provoque une modulation allostérique des récepteurs nicotiques présynaptiques, ce qui augmente la libération de neuromédiateurs (Maelicke, A. *et al* 2001). Son effet indésirable le plus fréquent est son action émétique.

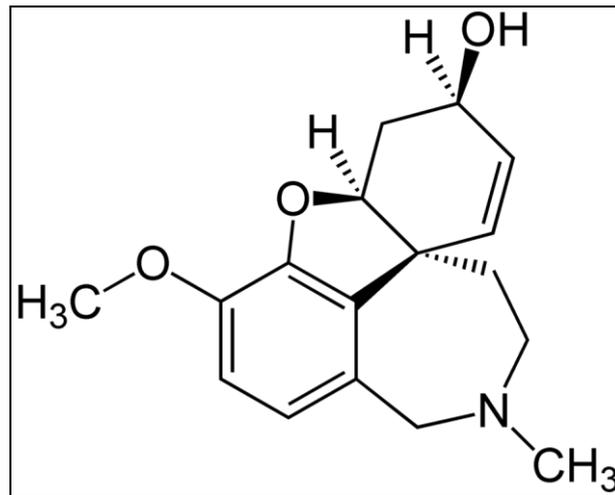


Figure 6. Structure chimique de la galantamine

Bien que ces médicaments aient prouvé leur efficacité quant à l'inhibition des ChE, les grandes agences de santé ne recommandent plus leur utilisation à cause de ses nombreux effets secondaires surtout de type digestif (nausées et vomissement) intolérables par les personnes âgées. Ceci ouvre la voie à une autre perspective de recherche de nouvelles molécules bioactives moins contraignantes que celles déjà connues sur le marché. C'est dans ce même contexte que s'inscrit cette thèse de doctorat dont le but est de contribuer au développement de nouveaux inhibiteurs de l'AChE en faisant appel à deux approches complémentaires : criblage virtuel *in silico* conforté par des analyses biologiques *in vitro*.

Chapitre 2 :

Acétylcholinestérase

1. Hypothèse cholinergique et implication des cholinestérases dans la MA

L'ACh est un neurotransmetteur essentiel impliqué aussi bien dans les processus d'apprentissage, de concentration, de mémorisation à court ou long terme, que dans le système nerveux périphérique (Thapa, S. et *al* 2017). Elle est produite dans les neurones cholinergiques pré-synaptiques, à partir de la choline et l'acetyl-Coenzyme A. Lors d'un influx nerveux, un potentiel d'action arrive stimulant la libération de l'ACh dans la fente synaptique afin de se fixer aux différents récepteurs muscariniques et nicotiques post-synaptiques. Suite à la propagation de l'influx nerveux, l'ACh est aussitôt dégradée principalement par l'AChE et la BChE en choline laquelle est par la suite recyclée (Figure 7). (Singh, R. et *al* 2019).

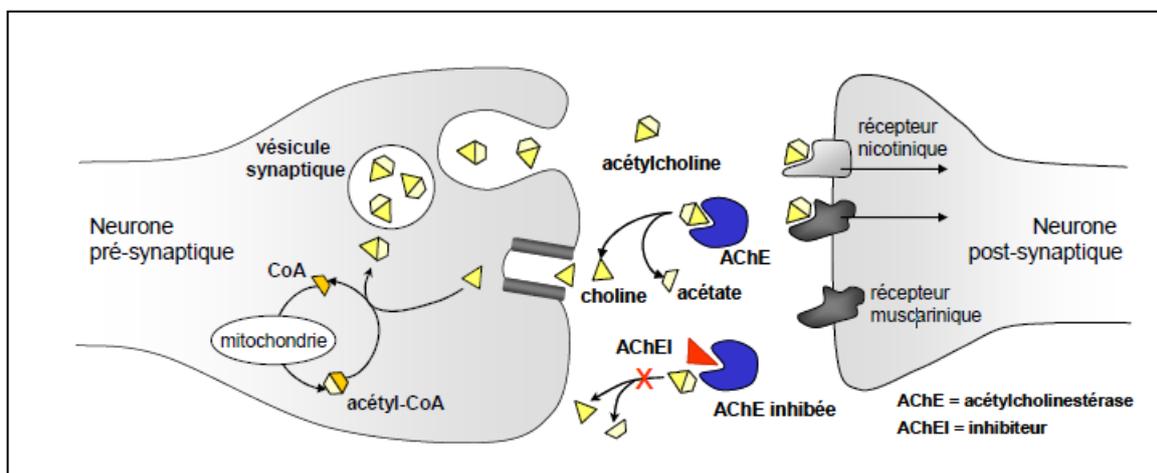


Figure 7. Représentation schématique du mécanisme de neurotransmission cholinergique (Urbain, A. 2007).

Plusieurs études ont démontré que l'enzyme catalysant la synthèse de l'ACh, la choline acétyltransférase, est nettement déficitaire chez les personnes atteintes de la MA (Perry, E.K. et *al* 1977; Rossor, M.N. et *al* 1982; Rinne, J.O. et *al* 1988). Il en résulte une diminution parfois massive des taux de neurotransmetteurs circulant dans le cerveau. Le déficit en ACh peut atteindre jusqu'à 90% dans les stades sévères de la maladie. Ces observations ont conduit à l'hypothèse cholinergique admettant que les troubles cognitifs liés à cette maladie sont principalement dus à un déficit cholinergique (Bartus, R.T. et *al* 1982 ; Cummings, J.L. et *al* 1996). L'une des stratégies thérapeutiques de la MA consiste à pallier le déficit en ACh en inhibant les ChE responsables de sa dégradation : l'AChE notamment et la BChE.

2. Rôle physiologique des cholinestérases

Le terme cholinestérase a été proposé pour la première fois en 1932 pour décrire une enzyme capable d'hydrolyser non seulement l'ACh mais aussi et d'autres esters de la choline tels que la butyrylcholine (BCh) et la succinylcholine (Stedman, E. et *al* 1932). Quelques années plus tard, des études ont confirmé l'existence, en fait, de deux enzymes hydrolysant les esters de la choline, distinguées par leur affinité pour l'ACh et la BCh (Alles, G.A. et *al* 1940 ; Mendel, B. et *al* 1943). La première enzyme présente dans les tissus nerveux, jonctions neuromusculaires et érythrocytes a été nommée AChE ou ChE vrai, portant le numéro de code EC 3.1.1.7. La seconde, ChE non spécifique ou BChE, a porté de nombreux synonymes (ChE sérique, plasmatique, pseudo-cholinestérase ou ChE type 5) avec le numéro de code EC 3.1.1.8 (Pope, C.N. et *al* 2018). Chez l'Homme, le gène codant pour l'AChE se situe sur le chromosome 7q22, et fait environ 7 kb (6 exons et 4 introns) (Fagerberg, L. et *al* 2014). Celui de la BChE, localisé sur le chromosome 3q26, est beaucoup plus étendu (73 kb) et contient 4 exons dont le second contient 83% de la séquence codante de la protéine mature, l'extrémité N-terminale et le site catalytique (Jasiecki, J. et *al* 2019).

2.1. Acétylcholinestérase

L'AChE est une enzyme fondamentale pour la survie de l'organisme de par son rôle dans la transmission de l'influx nerveux. Si son fonctionnement est altéré, les dommages occasionnés sur l'organisme peuvent être très importants. Dans cette situation, les neurones cholinergiques ne retrouvent jamais leur état de repos, finissant ainsi par cesser de fonctionner. En revanche, si elle fonctionne trop par rapport à la quantité d'ACh dans la fente synaptique, l'influx nerveux n'est pas correctement transmis, ce qui crée une détérioration des fonctions cognitives et neuromusculaires, comme c'est le cas pour la MA (Kwasniewski, O. 2010).

L'AChE est une protéase à sérine qui se trouve principalement au niveau des synapses cholinergiques du système nerveux central ainsi qu'au niveau des jonctions neuromusculaires, érythrocytes (Wandhammer, M. 2012). En accord avec son rôle dans la régulation de la transmission de l'influx nerveux, l'AChE est parmi les enzymes les plus rapides de la nature. Son turnover (k_{cat}) varie de 10000 à 20000 molécules hydrolysées par seconde, et son efficacité catalytique (k_{cat}/K_m) est d'environ $1.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ (Colletier, J.P. et *al* 2007). Il est important de signaler que la limite théorique pour l'efficacité catalytique d'une enzyme

donnée est estimée entre 10^8 et 10^9 $M^{-1}.s^{-1}$; l'AChE peut donc être considérée comme cinétiquement ou catalytiquement une enzyme « parfaite » (Stroppolo, M.E. et al 2001).

Dans le système nerveux périphérique, lorsque l'ACh se lie à l'un de ses récepteurs sur les fibres musculaires notamment, des canaux à calcium s'ouvrent dans la membrane cellulaire, ce qui permet l'entrée d'ions calcium dans la cellule. S'ensuit alors une série d'étapes qui mènent à la contraction musculaire (Kwasnieski, O. 2010). L'un des dommages observés dans le tissu cérébral lors de la MA est l'accumulation des plaques amyloïdes. Des études ont prouvé l'implication de l'AChE dans l'accélération de l'assemblage de ces plaques par l'intermédiaire de son site périphérique (Inestrosa, N.C. et al 1996 ; Alvarez, A. et al 1997).

2.2. Butyrylcholinestérase

La BChE quant à elle, est abondante notamment au niveau plasmatique (environ 5mg/ml). Elle est présente également dans de nombreux tissus tels que le foie, l'intestin, les poumons, le cœur, les muscles ainsi que le cerveau mais jamais dans les érythrocytes. Cette enzyme présente de nombreuses homologies avec l'AChE, notamment au niveau de sa séquence (54%), de sa structure tridimensionnelle et de son mécanisme catalytique (Wandhammer, M. 2012). En effet, des études sur des souris dont le gène de l'AChE a été délété, montrent que la BChE peut se substituer à l'AChE dans la dégradation de l'ACh lorsque celle-ci est inhibée ou absente (Lejus, C. et al 1998 ; Li, B. et al 2000 ; Girard, E. et al 2007). Dans ce même contexte, d'autres études ont indiqué que certains neurones cholinergiques se servent de la BChE plutôt que l'AChE pour cliver l'ACh. Ainsi 10 à 15% des neurones cholinergiques dans l'hippocampe et l'amygdale, expriment la BChE au lieu de l'AChE (Darvesh, S. et al 1998 ; Darvesh, S. et al 2003).

Néanmoins, ce n'est pas son seul rôle. Il s'est avéré, d'après certaines études, que la BChE participe à la détoxification plasmatique des composés estérifiés tels que la succinylcholine, l'héroïne et la cocaïne (Li, B. et al 2005). Par exemple, la succinylcholine utilisé comme curare de courte durée, est uniquement hydrolysé grâce à la BChE. Chez certains patients, une mutation (D70G) à l'entrée du site actif de l'enzyme altère l'affinité pour ce substrat. L'emploi de la succinylcholine entraîne alors des apnées prolongées (Masson, P. et al 1997 ; Mollerup, H.M. et al 2011). Il a été également prouvé que la BChE hydrolyse la cocaïne (Lynch, T.J. et al 1997). Des études actuelles ont pour objet la

modification de la BChE afin de lui conférer une meilleure activité cocaïne hydrolase (Xue, L. et *al* 2011).

3. Organisation structurale liée à la fonction de l'AChE

Les ChE, tout comme la trypsine, la chymotrypsine et l'élastase, font partie de la famille des carboxylestérases de type B (Carr, P.D. et *al* 2009). Cette famille est aussi connue sous le nom α/β hydrolases à sérine puisque ses enzymes se structurent autour d'un feuillet β flanqué d'hélices α . De plus, leur site actif est une triade catalytique contenant principalement un résidu sérine nucléophile activé par un relais de protons impliquant un résidu acide (Asp ou Glu) et une histidine. Les ChE possèdent des sites de N-glycosylation (Asn-X-Ser/Thr), 3 sites pour l'AChE, et 9 pour la BChE (Nachon, F. et *al* 2002). Ces glycanes contribuent à la sécrétion, la solubilité et la stabilité de l'enzyme dans son environnement, sans influencer ses propriétés catalytiques (Nachon, F. 2016).

3.1. Structure tridimensionnelle de l'AChE

La structure tridimensionnelle de l'AChE a été résolue pour la première fois par Sussman et al. en 1991 à partir du poisson torpille (*Torpedo californica*) (Sussman, J.L. et *al* 1991). Quelques années plus tard, celle de l'AChE humaine a aussi été caractérisée (Kryger, G. et *al* 2000). Il s'agit d'une enzyme homodimérique ayant un poids moléculaire de 75 kDa dont chaque sous unité regroupe 543 acides aminés. D'un point de vue structural, cette enzyme est constituée de 12 feuillets β entourant 14 hélices α ainsi que d'une courte portion de feuillet, à l'extrémité N-terminale, qui n'est engagée dans aucune interaction avec le reste de la structure (Figure 8) (Kwasnieski, O. 2010). Ce repliement, mis en évidence par Ollis et *al*, est typiquement celui de la famille des α/β hydrolases (Ollis, D.L. et *al* 1992).

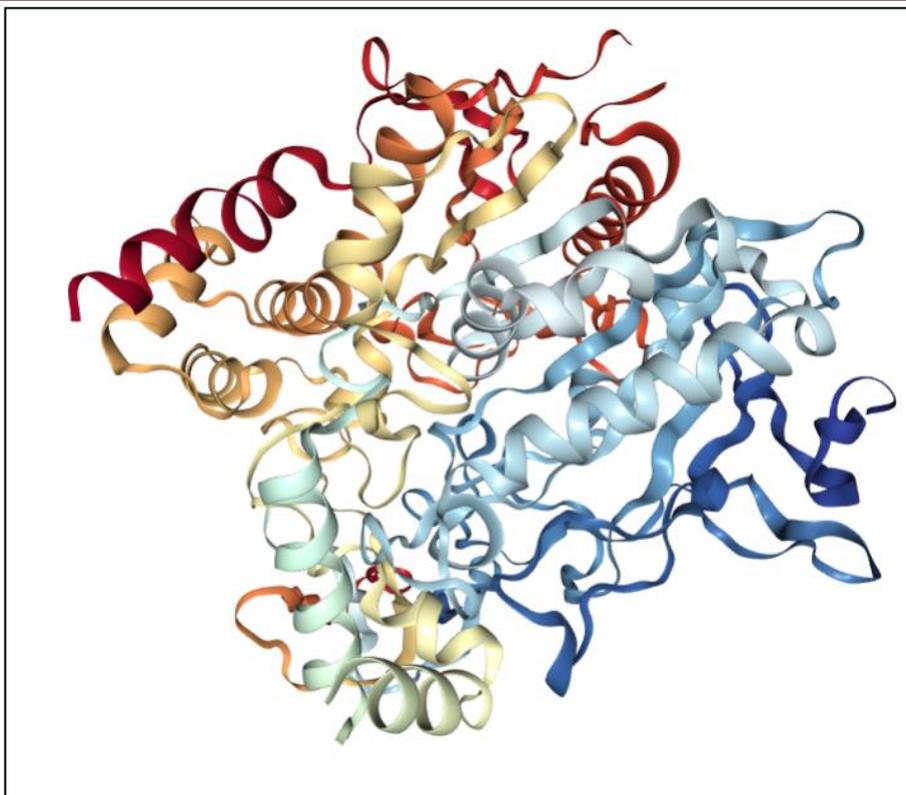


Figure 8. Structures tertiaire d'un monomère de la AChE humaine (Code PDB : 4B41). Structure tridimensionnelle avec représentation des hélices α et feuillets β en mode « new cartoon ». La coloration en arc-en-ciel va du domaine C-terminal en rouge au domaine N-terminal en bleu

3.2. Site actif de l'AChE

Les connaissances structurales de l'AChE humaine ont permis de comprendre son mécanisme catalytique à l'échelle moléculaire. En effet, l'examen détaillé de sa structure cristallographique révèle l'existence d'une gorge profonde (20Å de profondeur) et étroite (5Å de diamètre) au niveau de laquelle s'effectue l'hydrolyse de l'ACh. Deux sites adjacents d'interactions caractérisant cette gorge sont illustrés dans la figure 9: le site périphérique (PAS) à l'entrée, et le site catalytique (CAS) au fond, où se trouve la machinerie catalytique (Dvir, H. et *al* 2010). Le CAS et le PAS constituent ainsi deux cibles potentielles en vue de l'inhibition de l'AChE (Oukoloff, K. et *al* 2019)

3.2.1. Le site catalytique de l'AChE (CAS)

La machinerie catalytique de l'AChE qui se trouve au fond de la gorge, est principalement organisée autour de la triade catalytique constituée des résidus Ser203, His447 et Glu334 (Gerlits, O. et *al* 2019) (figures 10 et 11). Des études par mutagenèse ont montré l'importance de ces résidus dans l'hydrolyse de l'ACh. En effet, si l'on remplace l'un de ces

trois résidus par une alanine, une baisse importante de l'activité de l'enzyme est observée (Fuxreiter, M. et *al* 1998). Le mécanisme de l'hydrolyse de l'ACh par la triade catalytique de l'enzyme sera développé dans la section 4- Mécanisme d'hydrolyse de l'ACh page 19.

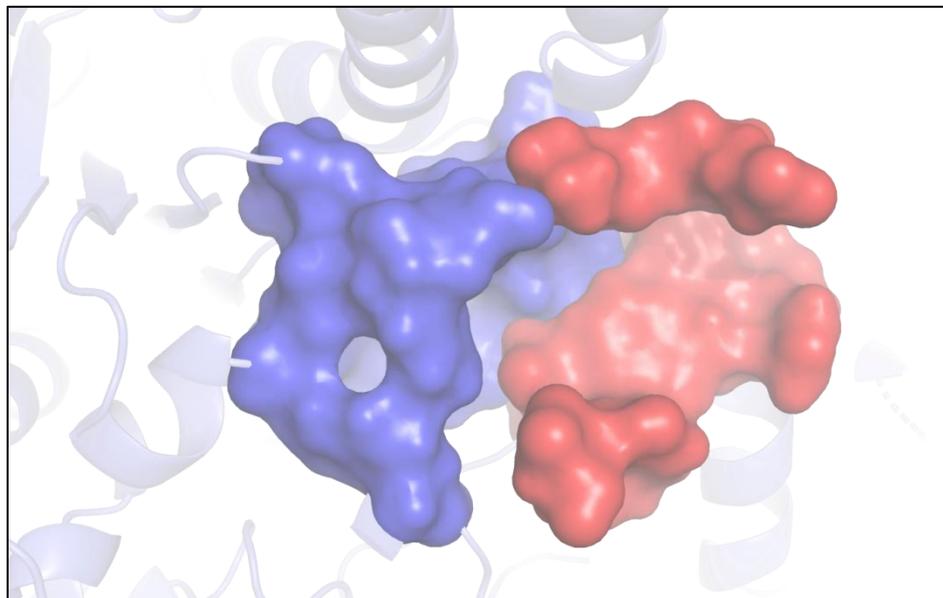


Figure 9. Site actif de l'AChE (code PDB : **4M0E**). La structure secondaire de l'enzyme est représentée par des « cartoons » gris. Les surfaces du CAS et du PAS sont représentées en bleu foncé et rouge respectivement.

Au-delà de la triade catalytique, trois principales régions essentielles pour l'activité hydrolytique de l'enzyme peuvent être définies au niveau du CAS ;

Le sous-site anionique constitué des résidus Trp86 et Tyr337, permet la fixation de la partie choline de l'ACh par des interactions de type π -cation. Dans ce contexte, une étude par mutagenèse met bien en état l'importance du résidu Trp86 dans la fixation du substrat car son remplacement par une alanine diminue l'activité enzymatique d'un facteur de 1000 (Ordentlich, A. et *al* 2004 ; Kwasnieski, O. 2010). De même, une autre étude révèle qu'environ 50% de l'énergie d'interaction entre l'enzyme et son substrat est directement imputable au sous site anionique. Les résidus Trp86 et Tyr337 sont les deux plus importants contributeurs à cette énergie (Harel, M. et *al* 1996).

La poche acyle, une petite cavité hydrophobe proche de la triade catalytique, est constituée de résidus aromatiques Ph295, Phe297, Trp236 et Phe338. Ceux-ci sont responsables de la sélectivité de l'AChE vis-à-vis de l'ACh. En effet, du fait de

l'encombrement stérique qu'ils induisent, seuls la chaîne carbonée de la partie acyle de l'ACh peut s'y fixer via des interactions de Van der Waals (Vagedes, P. et *al* 2000). Ainsi, il a été démontré que ces résidus servent également à stabiliser la position de l'His447, et participent donc par ce biais à l'efficacité catalytique de l'AChE (Barak, D. et *al* 2002).

Le trou oxyanion, composé des résidus Gly121, Gly122 et Ala204, est une zone très importante pour la réactivité de l'AChE. Chaque NH- de ces résidus contribue, via des liaisons hydrogènes, à la stabilisation de l'intermédiaire acyl-enzyme qui se forme au cours de l'hydrolyse de l'ACh (voir section : 4- Mécanisme d'hydrolyse de l'ACh page 19) (Colletier, J.P. et *al* 2006).

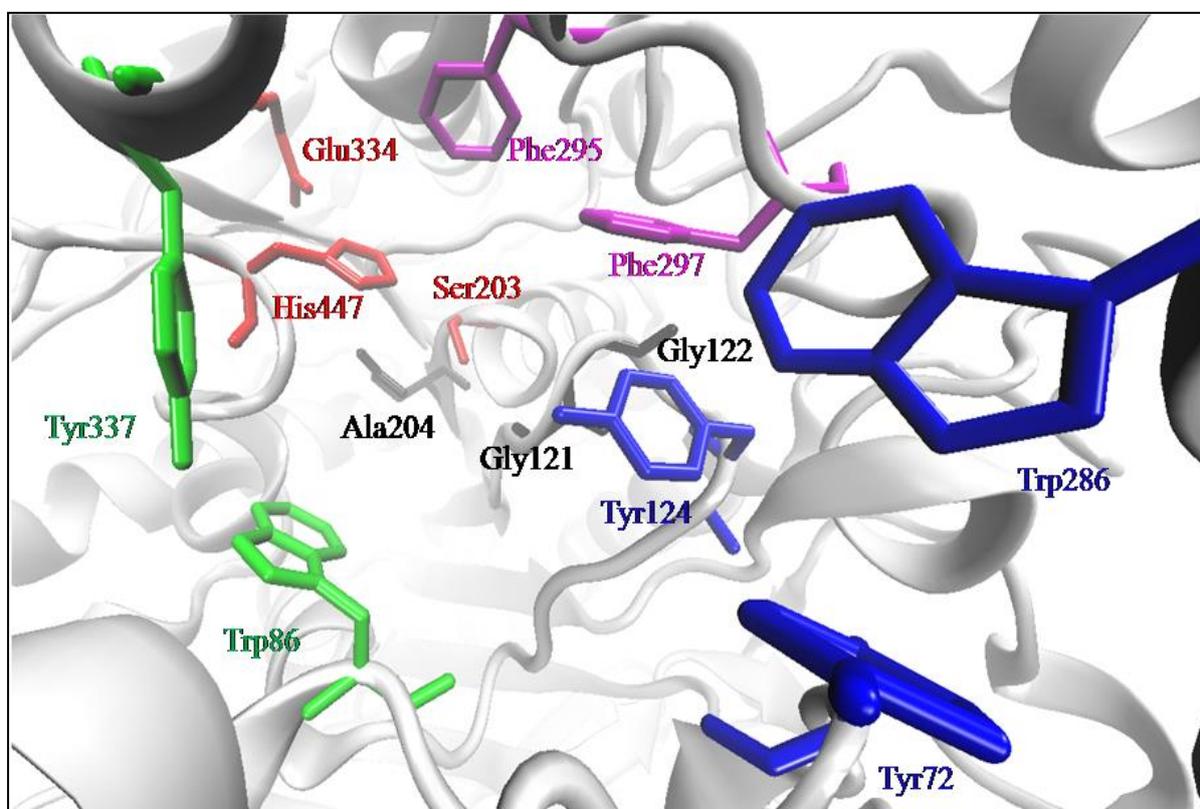


Figure 10. Site actif de l'AChE humain (code PDB : 4EY7). Le site périphérique à l'entrée de la gorge (Bleu : Trp286, Tyr72 et Tyr124). Au fond de la gorge, la triade catalytique (rouge: Ser203, His447 et Glu334), le trou oxyanion (gris : Ala204, Gly121 et Gly122), la poche « acyle » (magenta: Phe295 et Phe297) et la poche anionique (vert : Trp86 et Tyr337).

3.2.2. Le site périphérique de l'AChE (PAS)

Pour que l'hydrolyse ait lieu, l'ACh doit d'abord se pénétrer à l'intérieur de la gorge catalytique de l'enzyme et se positionner correctement vis-à-vis de la triade catalytique. (Mason, J.W. et *al* 2017). Ainsi, le PAS notamment constitué des résidus Tyr72, Tyr124 et

Trp286, se situe à l'entrée de cette gorge (figures 10 et 11). Il permet d'y contrôler l'accès en fixant des ligands cationiques (y compris l'ACh) par des interactions de type π -cation. Ce site est considéré comme cible potentielle car son inhibition entraîne un blocage de l'entrée du substrat dans le site actif ce qui diminue significativement l'activité de l'AChE (Johnson, G. et *al* 2006).

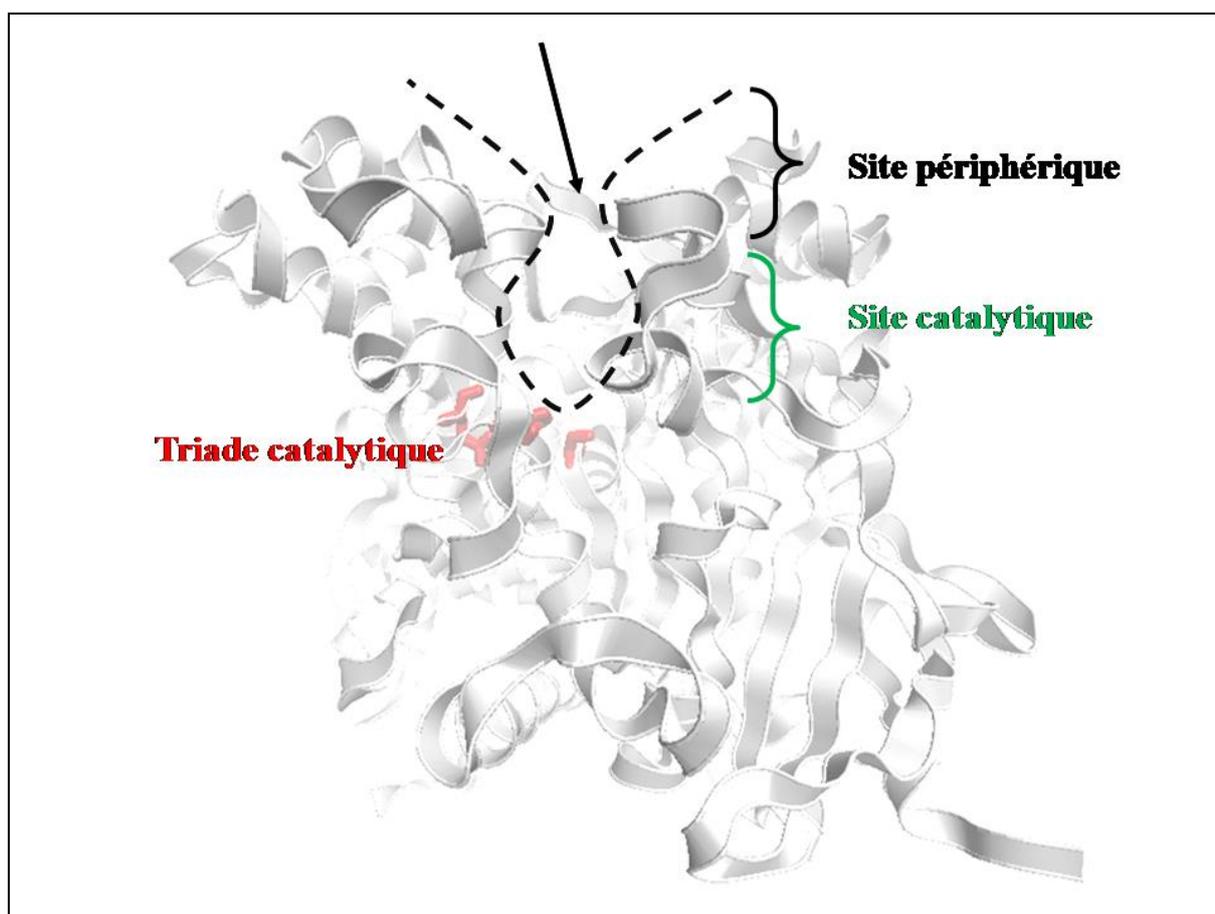


Figure 11. Structure tridimensionnelle de l'AChE humaine (code PDB : 4EY7). La forme de la gorge est esquissée par une ligne noir pointillée. L'entrée de la gorge est indiquée par une flèche. La triade catalytique est colorée en rouge.

4. Mécanisme d'hydrolyse de l'acétylcholine

Le mécanisme de l'hydrolyse de l'ACh en choline et en acide acétique, représenté dans la figure 12, se déroule en deux principales étapes : l'acylation et la déacylation. Au préalable, le substrat est attiré par le PAS où il se fixe puis pénètre vers le site actif (Mason J.W et *al* 2017), pour être hydrolysé (1). Une fois l'ACh est positionnée correctement vis-à-vis de la triade catalytique, une étape d'acylation à lieu par un mécanisme d'addition élimination : addition de l'oxygène de la sérine sur le carbonyle de l'ACh (2), puis élimination de la choline

(3). Il est à noter que l'histidine de la triade catalytique permet le déplacement de cette étape vers la formation du complexe acyl-enzyme (4) en captant le proton de la sérine. Ce proton va ensuite être capté par la choline qui quitte le site actif (élimination). De son côté, le glutamate de la triade permet à la fois de polariser l'histidine et de la maintenir dans une orientation favorable à ce transfert. Le complexe acyl-enzyme ainsi obtenu est stabilisé par le trou oxyanion. Par la suite, une molécule d'eau s'ajoute sur ce complexe, et l'acide acétique est éliminé: c'est l'étape de déacylation (5) (Kwasnieski, O. 2010 ; Sanson, B. 2009).

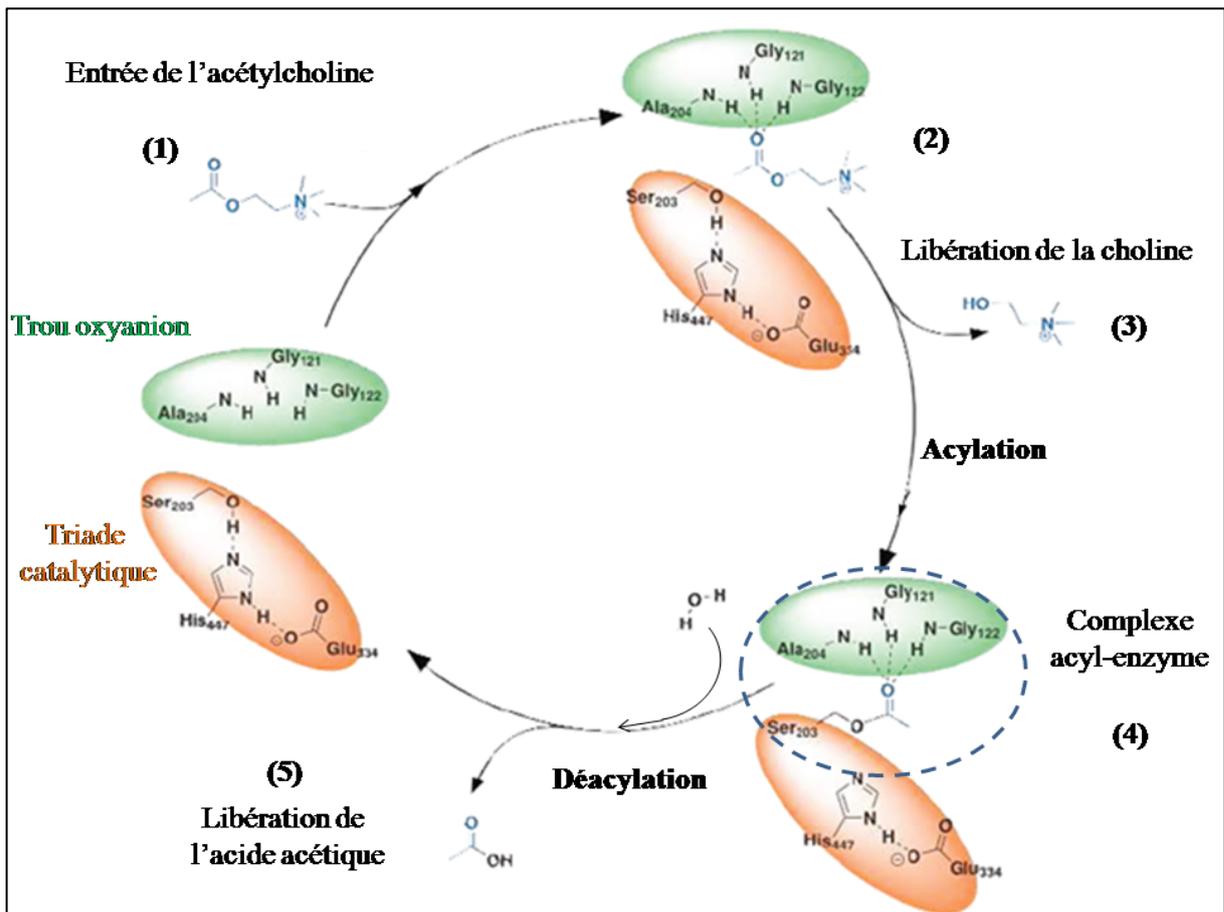


Figure12. Cycle catalytique de l'hydrolyse de l'Acétylcholine.

Chapitre 3 :

Criblage virtuel

1. Processus de conception d'un nouveau médicament

La conception d'un nouveau médicament (*drug design*) suit un processus de recherche très long, fastidieux et particulièrement onéreux. En effet, dès les premières phases de recherches jusqu'à l'obtention d'une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM), le temps nécessaire à la découverte d'un nouveau médicament tourne autour d'une moyenne d'environ 12 à 14 ans pour un coût global pouvant dépasser un milliard de dollars (Morgan, S. et *al* 2011). D'un point de vue général, un composé parvient à obtenir une AMM en tant que médicament sur au moins 10 000 molécules testées (Empereur-Mot, C. 2017).

1.1. Identification d'une cible thérapeutique

Le processus de découverte d'un nouveau médicament doit forcément débiter par l'identification d'une cible thérapeutique potentielle et pertinente dont on pourra moduler l'activité afin d'enrayer un processus pathologique donné. Cette phase est aussi appelée "pré-découverte", puisqu'elle précède l'étape de découverte du médicament à proprement parlé. Communément, un processus physiopathologique d'une maladie donnée comporte plusieurs cascades d'évènements, impliquant chacune plusieurs protéines et d'autres entités biologiques (Yang, Y. et *al* 2012). L'objectif est donc de comprendre ces cascades de réactions, de la manière la plus complète possible, afin de discerner les éléments de dysfonctionnement et d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles. Enzymes, protéines ou récepteurs, leur action et leur lien de causalité avec la maladie une fois connus, on cherchera soit à bloquer ou à augmenter leur action, soit à combler leur déficit, soit à remplir la fonction qu'ils ne peuvent plus exécuter (Lindsay, M.A. 2005).

Pour définir le potentiel d'une entité biologique à devenir une cible thérapeutique, trois critères essentiels sont à prendre en considération : son efficacité dans l'altération du processus pathologique en question, sa sécurité à altérer ce processus sans induire des effets secondaires importants et enfin son caractère « *druggable* ». Une cible est définie comme « *druggable* » lorsqu'il est possible de moduler son activité et induire l'effet souhaité en y liant de petites molécules. La dernière estimation portait à 500 le nombre de cibles thérapeutiques qui sont modulées par des médicaments commercialisés, mais ce nombre est en constante augmentation quand on sait que le génome humain comporte environ 35 000 gènes distincts et environ 200 000 protéines dont un bon nombre d'entre elles sont très certainement impliquées dans le développement des pathologies (Corr, P.W. 2009).

1.2. Identification des touches (hits)

La cible étant identifiée, l'étape suivante consiste à rechercher des touches (hits) ; c'est-à-dire des molécules capables d'interagir avec la cible en modulant son activité afin d'altérer le processus pathologique en question. Par le passé, les compagnies pharmaceutiques faisaient habituellement appel au criblage à haut débit où l'activité (ou plutôt l'affinité) des milliers, voir millions de composés est systématiquement testée *in vitro* (Haga, J.H. et al 2016). Cependant, la mise en place des tests *in vitro*, pour certaines cibles thérapeutiques, peut s'avérer très compliquée et leur utilisation lors d'un criblage de milliers de composés est parfois irréalisable aux vues des coûts aussi bien financiers que temporels (Ghemtio, L. 2010). Pour pallier ces difficultés, les compagnies pharmaceutiques font actuellement recours aux approches par criblage virtuel consistant à prédire *in silico* l'activité d'un très grand nombre de ligands envers la cible d'intérêt. Ces méthodes présentent le triple avantage d'être plus aisées à mettre en œuvre, relativement rapides pour un coût bien moindre que les criblages expérimentaux (Lagarde, N. 2014). Le criblage virtuel est, depuis quelques années, utilisé en préambule des techniques *in vitro* en tant que premier filtre afin de sélectionner des listes réduites de molécules présentant l'activité souhaitée (souvent entre 100 et 1000). Seules, ces molécules prometteuses seront testées expérimentalement (Haga, J.H. et al 2016).

1.3. Génération et optimisation des leads

Après l'identification des hits, l'étape suivante consiste à les optimiser afin de les rendre plus actifs et sélectifs, à faciliter leur pénétration en cellules et le cas échéant, à les rendre moins toxiques. Cette étape nécessite l'intervention des chimistes médicaux et de chimoinformaticiens qui font varier les structures chimiques des hits précédemment identifiés par l'ajout ou le retrait de groupements fonctionnels, tout en conservant leurs châssis moléculaires. Les propriétés des composés nouvellement synthétisés (activité, sélectivité, toxicité, ...etc) sont comparées à celles des hits et permettent ainsi de guider la sélection de nouveaux « têtes de série » ou « leads » (Yu, W. et al 2017). Lors de cette phase, il convient également d'établir une étude des propriétés pharmacocinétiques des leads qui déterminent la capacité de celles-ci à être un bon candidat médicament (composés dits « *drug-like* ») (Leeson, P. et al 2007 ; Vistoli, G. et al 2008). C'est à ce stade que les données scientifiques et techniques sur le composé candidat, telles que sa structure moléculaire et ses effets, sont généralement enregistrées ou brevetées, afin que le composé soit protégé en tant que propriété intellectuelle.

1.4. Tests pré-cliniques

Après avoir obtenu des *leads* optimisés, une série de tests pré-cliniques doivent être réalisés *in vivo* (sur cellules et sur animaux) afin d'évaluer leur innocuité (toxicité, mutagenèse, cancérogenèse,...), leur action sur les organes cibles, ainsi que leur cycle de vie dans l'organisme (absorption, propagation, élimination). Cette étape est très importante puisque elle permet de prendre la décision d'administrer les candidats médicaments retenus chez l'homme au cours des essais cliniques suivants (Zhou, J. et *al* 2016).

1.5. Essais cliniques

Les essais cliniques constituent l'étape la plus critique et la plus coûteuse du processus de conception d'un nouveau médicament. L'efficacité du candidat médicament chez l'homme, ainsi que sa pharmacocinétique et sa sécurité d'emploi sont évaluées et consignées. Ces essais obéissent non seulement à des impératifs scientifiques rigoureux mais aussi à un cadre réglementaire et législatif extrêmement strict qui aboutit aux procédures et aux modalités d'évaluation du dossier d'AMM (Lagarde, N. 2014). Les essais cliniques sont divisés en quatre phases ; les trois premiers permettent d'établir l'efficacité et la sécurité du candidat médicament chez l'homme afin d'obtenir une AMM alors que la quatrième consiste en la surveillance des effets secondaires dès la commercialisation et l'utilisation du médicament (phase de pharmacovigilance). Il est à souligner que si des effets indésirables inacceptables sont détectés, l'étude clinique peut prendre fin et le candidat ou médicament peut être abandonné de manière définitive (Wang, D. et *al* 2006).

La **phase I** des essais cliniques correspond à la première administration à l'homme, effectuée sur un faible nombre de volontaires sains (20 à 80) durant 6 à 18 mois. Cette phase permet d'évaluer la tolérance ou l'absence d'éventuels effets secondaires liés à l'administration croissante du candidat médicament et de déterminer sa dose maximale tolérable. Environ 54% des candidats médicaments testés passent avec succès cette première phase (Paul, S. M. et *al* 2010).

La **phase II** se déroule en général en milieu hospitalier, sur un groupe homogène de 100 à 200 malades durant 2 à 3 ans. Elle vise à vérifier l'efficacité du candidat médicament en déterminant sa dose optimale c'est-à-dire celle pour laquelle l'effet thérapeutique est meilleur pour le moins d'effets secondaires. Seuls, 18% des essais cliniques démarrés accèdent à la phase suivante (Paul, S. M. et *al* 2010).

Les essais de la **phase III**, de plus grande envergure, sont conduits sur plusieurs milliers de patients hétérogènes atteints de la maladie en question. Cette phase vise à confirmer le potentiel thérapeutique du candidat médicament ainsi que sa tolérance (interactions, effets indésirables...). Les règles méthodologiques sont très précises et l'essai doit être mené en double aveugle avec tirage au sort. En effet, les traitements ou placebo sont attribués de manière aléatoire à deux groupes de patients et aux médecins chargés du suivi afin de diminuer la part de subjectivité lors de l'évaluation (Zhou, J. et *al* 2016). Une AMM est délivrée en cas de succès et le suivi post-commercialisation constitue la **phase IV**. Généralement, seul un médicament sur quinze candidats évalués peut obtenir cette autorisation (Ghemtio, L. 2010).

2. Criblage virtuel : méthode alternatives pour la découverte de médicaments

Depuis ces 20 dernières années, le criblage virtuel a pris une importance croissante dans le processus de conception de médicaments, particulièrement lors de l'identification des hits et l'optimisation des *leads* (Baig, M.H. et *al* 2016). Cette approche permet de simuler l'affinité d'un très grand nombre de composés (généralement entre cent mille et dix millions) envers une cible thérapeutique donnée afin de faire ressortir ceux les plus susceptibles d'être actifs. Grâce à cette approche, les compagnies pharmaceutiques peuvent écarter au préalable les composés supposés inactifs afin de focaliser les tests *in vitro* seulement sur une liste réduite de molécules prometteuses, ce qui permet un réel gain en temps et en argent (Tanrikulu, Y. et *al* 2013).

Largement appuyé par les progrès en informatique et bioinformatique, l'intérêt porté aux méthodes de criblage virtuel a littéralement explosé au cours des vingt dernières années, comme en témoigne le nombre de publications recensées dans la base de données *PubMed* depuis 1997, date de la première publication évoquant le criblage virtuel (Horvath, D. 1997). (figure 13).

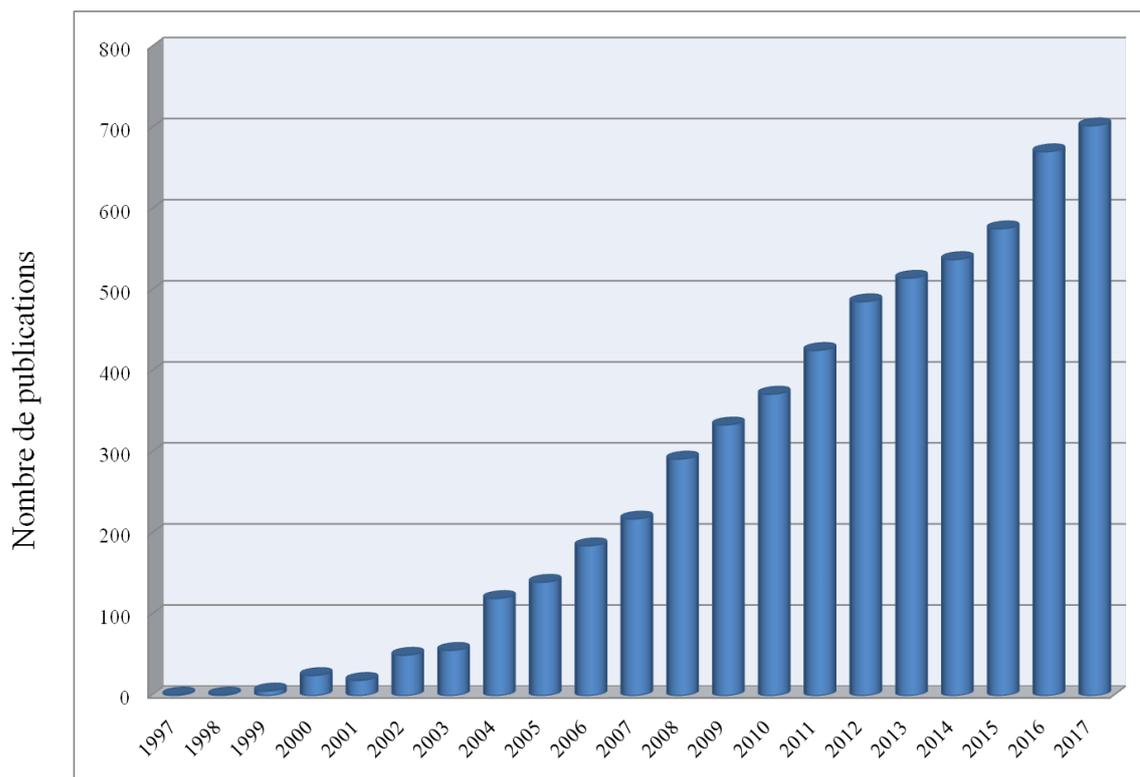


Figure 13. Evolution du nombre de publications de 1997 à 2015 dans la base de données *PubMed* en utilisant comme mot clés « *virtual screening* » (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

2.1. Outils du criblage virtuel

Les éléments indispensables pour réaliser un criblage virtuel se limitent en un récepteur macromoléculaire souvent de nature protéique appelé : cible, une collection de ligands appelée chimiothèque et un programme qui simule l'affinité des ligands au sein du récepteur étudié.

2.1.1. Cible

Les approches par criblage virtuel requièrent, en premier lieu, la disponibilité de la structure tridimensionnelle (3D) d'une cible souvent de nature protéique. La banque de données structurale de macromolécules la plus exhaustive, et donc logiquement la plus populaire, est la *Protein Data Bank* (PDB). Elle a été établie en 1971 au *Brookhaven National Laboratory* (Upton, NY, USA) sur l'impulsion d'un petit groupe d'experts afin de stocker les données cristallographiques de sept structures de macromolécules biologiques (Bernstein, F.C. et al 1977). Depuis octobre 1998, cette banque de donnée passe sous la gestion du *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics* (RSCB). Au fil du temps, le nombre de structures disponibles dans la PDB n'a cessé d'augmenter (Figure 14) et devrait bientôt

atteindre la barre symbolique des 150 000 d'ici la fin 2018. Les structures présentes dans la PDB sont majoritairement des protéines (135 000) et des acides nucléiques (15 000), essentiellement résolues par cristallographie aux rayons X et résonance magnétique nucléaire.

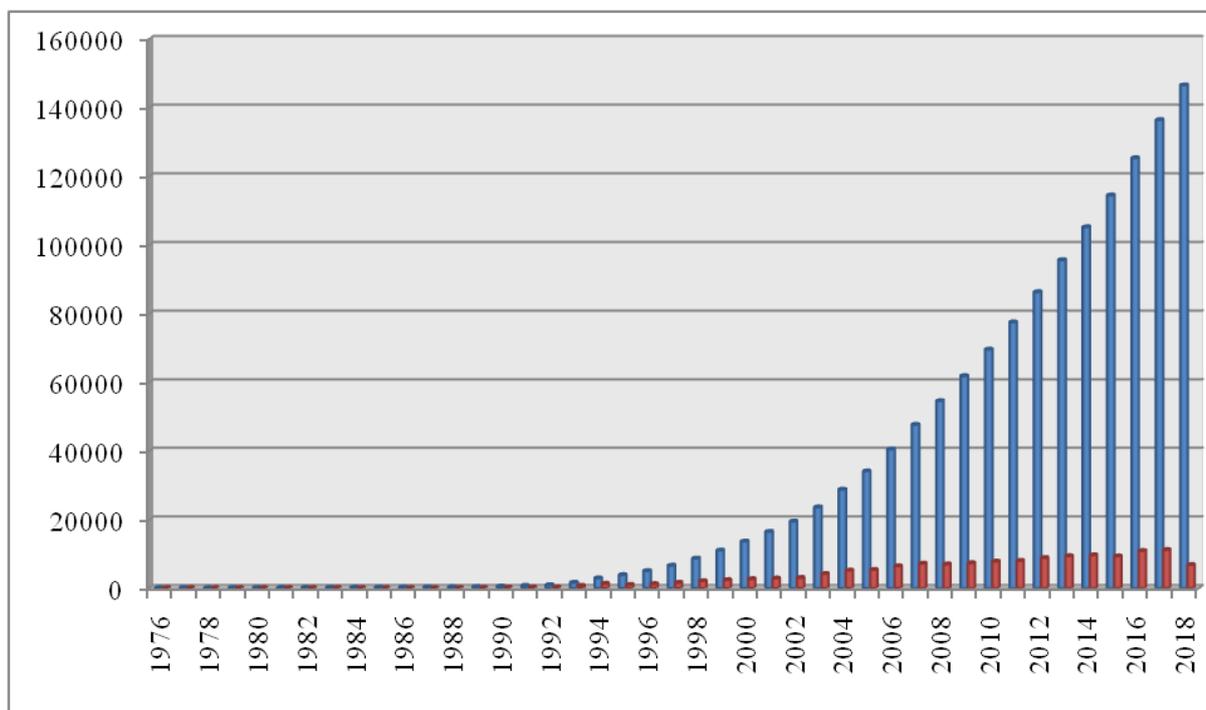


Figure 14. Evolution du nombre de structures disponibles dans la PDB depuis sa création jusqu'à 2018 (en bleu: nombre de nouvelles structures par an, en rouge: nombre total de structures cumulées) (<https://www.rcsb.org/stats>).

De nombreuses informations associées à chaque structure sont accessibles gratuitement à l'ensemble de la communauté scientifique, via le serveur internet de la PDB (<https://www.rcsb.org/>). On peut y trouver la séquence correspondante, ses coordonnées atomiques, les conditions expérimentales (par exemple, les conditions de cristallisation, la résolution...etc.), des images 3D (Elkaïm, J. 2011).

Même si de plus en plus de structures expérimentales de protéines sont disponibles, certaines restent encore non résolues. Dans ce cas, la modélisation par homologie constitue une solution. Une ou plusieurs protéines dont la structure 3D est résolue et qui présentent une bonne homologie de séquence avec la cible serviront de support pour en construire un modèle (Kryshtafovych, A. et al 2009). Ainsi, près de 25% des études de docking publiées entre 2000

et 2009 auraient utilisé une structure construite par homologie de séquence (Tuccinardi, T. 2009).

2.1.2. Chimiothèques

La probabilité d'identifier un nouveau composé capable de moduler l'action d'une cible thérapeutique donnée est relativement faible mais augmente avec le nombre de composés testés. Cependant, avec les moyens de calculs actuels, il serait impossible d'explorer par criblage virtuel l'espace chimique dans sa totalité (le nombre de molécules chimiques théoriquement synthétisables est estimé à 10^{60}) (Barker, A. et al 2013). Dès lors, le succès d'un criblage virtuel est directement conditionné par le choix de la chimiothèque à tester, sa taille, sa composition ainsi que la diversité des molécules qu'elle regroupe. Aujourd'hui, il existe plus de 800 chimiothèques, contenant soit des molécules issues de la chimie combinatoire, soit des substances naturelles, soit des molécules déjà connues comme intéressantes pour certaines cibles biologiques (Pihan, E. 2013). Généralement, bon nombre de chimiothèques proposent leurs molécules sous différents formats destinées au criblage virtuel (SDF, Smiles...etc.). Une fois une liste de composés prioritaires ait obtenu à l'issue d'un criblage virtuel, les molécules réelles (conditionnées en vrac ou en microplaques) peuvent être commandées et achetées facilement pour pouvoir les tester expérimentalement (Hazan, C. 2008).

Certaines chimiothèques renseignent les données d'activité biologiques correspondant aux composés qu'elles regroupent. Ces données peuvent être diverses selon la chimiothèque étudiée. Ainsi, la **PubChem** (Bolton, E. 2008), une chimiothèque publique gérée par le *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), répertorie à l'heure actuelle plus de 96 millions de composés avec une grande quantité de données de divers ordres : chimique, biochimique, pharmacologique, production, toxicologie et environnemental (K_i , IC_{50} , EC_{50} ...etc.). De même, la **ChEMBL** (Gaulton, A. et al 2012) une chimiothèque publique regroupant plus de 4 millions de composés, se base sur environ 70 000 publications scientifiques pour fournir les données d'activités biologiques de ses composés lorsque celles-ci sont disponibles. De son côté, la chimiothèque **ZINC** (Irwin, J.J. et al 2005), une autre chimiothèque publique, met à disposition plus de 35 millions de composés. Elle ne propose pas d'annotation directe de ses composés avec des valeurs d'activités biologique mais plutôt des liens vers d'autres bases de données, notamment la ChEMBL, contenant ces informations (Lagarde, N. 2014). La **chimiothèque nationale française** collecte, depuis septembre 2003,

plus de 70 000 composés et de 15 000 extraits naturels, issus des laboratoires académiques français. Une grande partie de ces composés est conditionnée sous une forme standardisée compatible avec un criblage expérimental (5 mM dans le DMSO, 10 mg/ml pour les extraits, plaques 96 ou 384 puits, livrées congelées). Ces produits peuvent être sollicités dans le cadre de collaborations scientifiques, au travers des procédures simples, rapides, peu onéreuses et protégées juridiquement (<http://chimiotheque-nationale.cn.cnrs.fr/>).

La **chimiothèque de l'institut Curie** est l'une des plus importantes chimiothèques académiques en Europe. Elle répertorie plus de 15 000 composés synthétisés par les chimistes de l'Institut Curie à Paris depuis plus de 60 ans. Les composés de cette chimiothèque sont disponibles en vrac (poudre) ou sous forme de microplaques à 96 ou 384 puits directement utilisables pour divers tests. Étant une chimiothèque académique, les composés qu'elle regroupe sont pour la plupart originaux et peu testés. (<https://science.curie.fr/plateformes/chimiotheque/>).

2.1.3. Programmes

Le docking moléculaire a pour objectif essentiel de prédire la conformation (position et orientation relative) la plus favorable d'un ligand au sein de son récepteur. Initié au début des années 1980, cette approche s'est développée pour devenir, de nos jours, un outil incontournable dans la recherche de produits biologiquement actifs. À présent, bon nombre de programmes du docking moléculaire (commerciaux ou non) sont disponibles. Les plus fréquemment cités sont représentés dans la figure 15. Une étude récente menée par Chen (Chen, Y.C, 2015) révèle que les programmes, AutoDock (Morris, G.M. et *al* 2009), Glide (Halgren, T.A. et *al* 2005) et GOLD (Jones, G. et *al* 1995) ont été utilisés dans plus de 50% des études de docking publiées entre 1990 et 2013.

Bien que ces programmes reposent le plus souvent sur des algorithmes spécifiques, leur protocole est composé de 2 étapes essentielles : La première, dite de « **docking** », permet aux ligands testés d'explorer l'espace conformationnel étudié. Chaque molécule adopte plusieurs conformations et plusieurs positions au niveau de son récepteur (Kitchen, D.B. et *al* 2004). La deuxième étape, dite de « **scoring** », permet d'évaluer les poses obtenues lors de la première étape pour ne retenir que la meilleure. Cette étape donne lieu à un score (affinité, énergie d'interaction...etc.) (Hazan, C. 2008).

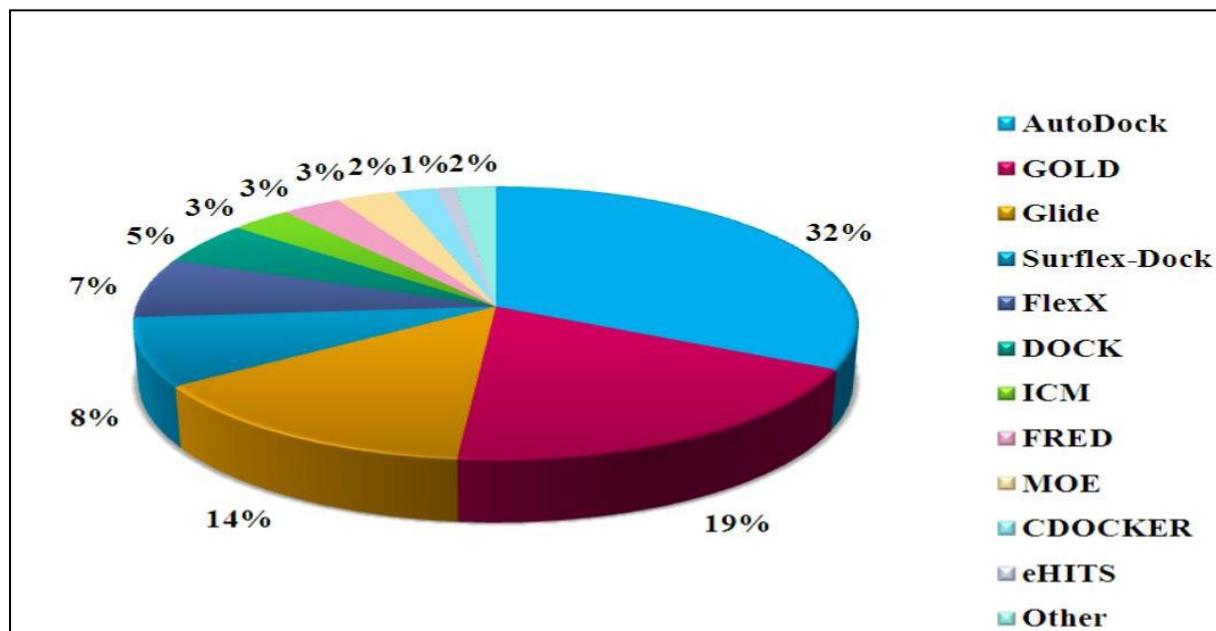


Figure 15. Fréquence de citation des logiciels de docking moléculaire entre 1990 et 2013 dans la base de données PubMed (Chen, Y.C. 2015).

2.2. Docking rigide, semi-flexible et flexible

Les premiers logiciels de docking développés au début des années 80 considéraient le récepteur et le ligand rigides en se basant sur le modèle « clé-serrure ». C'est sans aucun doute la catégorie la plus simple et rapide de docking. Depuis ces premiers pas, une idée s'est peu à peu imposée: les molécules ne sont pas figées, mais peuvent subir des modifications conformationnelles lors d'une interaction. Les procédures ont donc évolué vers une introduction de la flexibilité. Mis en marche plus tard, le docking semi-flexible a permis d'obtenir des résultats plus précis. Le récepteur est considéré comme corps rigide mais tient compte de la flexibilité du ligand. Ce type de docking reste le plus employé jusqu'à présent. Aujourd'hui, la puissance de calcul des ordinateurs permet, pour certains logiciels de docking, de traiter la flexibilité du ligand et de façon partielle le récepteur ; c'est le docking flexible (Rayar, A.M. 2017).

2.3. Algorithmes de recherches

Les algorithmes de docking ont été conçus pour rechercher de façon exhaustive, rapide et efficace les modes d'association récepteur-ligand les plus favorables. Ces algorithmes peuvent être classés en trois catégories : les algorithmes de recherche systématique, stochastique ou déterministe (Elkaïm, J. 2011).

2.3.1. Algorithmes de recherche systématique

Aussi appelées « algorithmes de fragmentation incrémentale », ces méthodes débutent par la fragmentation des ligands en parties rigides et en régions flexibles. Par la suite, les parties rigides sont positionnées en premier et le ligand est reconstruit de façon incrémentale en rajoutant les différents fragments flexibles, ce qui permet au ligand d'explorer diverses conformations lors de sa mise en place au sein du site actif (Abdolmaleki, A. et al 2017). Un des avantages principaux de cette approche, utilisée notamment dans les programmes DOCK (Lang, P.T. et al 2009), FlexX (Rarey, M. et al 1996) et Surflex-dock, (Jain, A.N. 2003) est de permettre un gain de temps de calcul.

2.3.2. Algorithmes de recherche stochastique

La seconde approche, aussi appelée stochastique, applique des mouvements de translation, rotations et torsions réalisés de manière aléatoire sur le ligand qui est considéré dans son entier. Ces algorithmes sont plus lents que celles par « fragmentation incrémentale » mais prennent mieux en compte la flexibilité du ligand et permettent l'exploration de régions plus vastes au sein du récepteur (Abdolmaleki, A. et al 2017). Les programmes AutoDock (Morris, G.M. et al 2009), Glide (Halgren, T.A. et al 2005) et GOLD (Jones, G. et al 1995) utilisent ce type d'algorithme.

2.3.3. Algorithmes de recherche déterministe

Ces méthodes comprennent notamment les simulations de dynamique moléculaire qui permettent d'observer finement la trajectoire (mouvement) d'une molécule et la stabilité des interactions établies au sein du site actif cible (Paquet, E. et al 2015). Si les temps de simulation restent trop élevés pour utiliser cette approche à large échelle, elle peut toutefois être envisagée pour optimiser et valider un petit nombre de poses moléculaires (Nichols, S. E. et al 2011).

2.4. Les différentes stratégies du criblage virtuel

Les méthodes de criblage virtuel ont été développées pour diminuer le coût et le temps considérable nécessaires au processus de conception d'un nouveau médicament. Ces méthodes peuvent être divisées en deux grandes classes selon la nature de certaines informations expérimentales disponibles. Ainsi, lorsque la structure 3D d'une cible est disponible, le criblage virtuel « *Structure-Based* » peut être employé afin d'évaluer et de

sélectionner les ligands capables de mieux interagir avec la cible d'intérêt (Lavecchia, A. et *al* 2013). La seconde approche, dite criblage virtuel « *Ligand-Based* », requière, comme son nom l'indique, la disponibilité d'un nombre suffisant d'informations concernant une ou plusieurs molécules actives de référence. Les relations structure-activité de ces ligands sont alors analysées en vue de guider la recherche et la conception de nouveaux composés potentiellement actifs (Lavecchia, A. et *al* 2013). Bien que ces deux approches soient souvent utilisées de manière exclusive (parce que la nature des données de départ ne laisse qu'un seul choix possible), leur combinaison lors d'un criblage virtuel permet de d'augmenter davantage les chances d'identifier de nouveaux composés actifs (Beautrait, A. 2008).

2.4.1. Criblage virtuel « *Structure-Based* »

Comme leur nom l'indique, les méthodes de criblage virtuel « *Structure-Based* » utilisent la structure 3D de la cible afin d'estimer la complémentarité structurale de chaque molécule criblée envers le site actif considéré. Pour cela, différentes approches peuvent être employées :

- a- La première catégorie s'intéresse à rechercher et à trouver un ou plusieurs composés actifs envers la cible d'intérêt dans une chimiothèque. Pour cela, un grand nombre de ligand est criblé sans tenir compte des contraintes structurales dues à la poche de liaison étudiée. Ainsi, ce type de criblage virtuel, qui connaît de plus en plus d'engouement, offre la possibilité d'identifier de nouvelles classes de molécules actives (Asses, Y. 2011).
- b- la deuxième catégorie, aussi connue sous le nom « conception *de novo* », consiste à concevoir *in silico* des composés ayant une complémentarité stérique et chimique envers la cible étudiée en y engageant le maximum possible de liaisons. La structure 3D du site actif cible est utilisée comme point de départ pour une construction incrémentale des ligands potentiels comme présenté dans la figure 16 (Schneider, G. et *al* 2005)

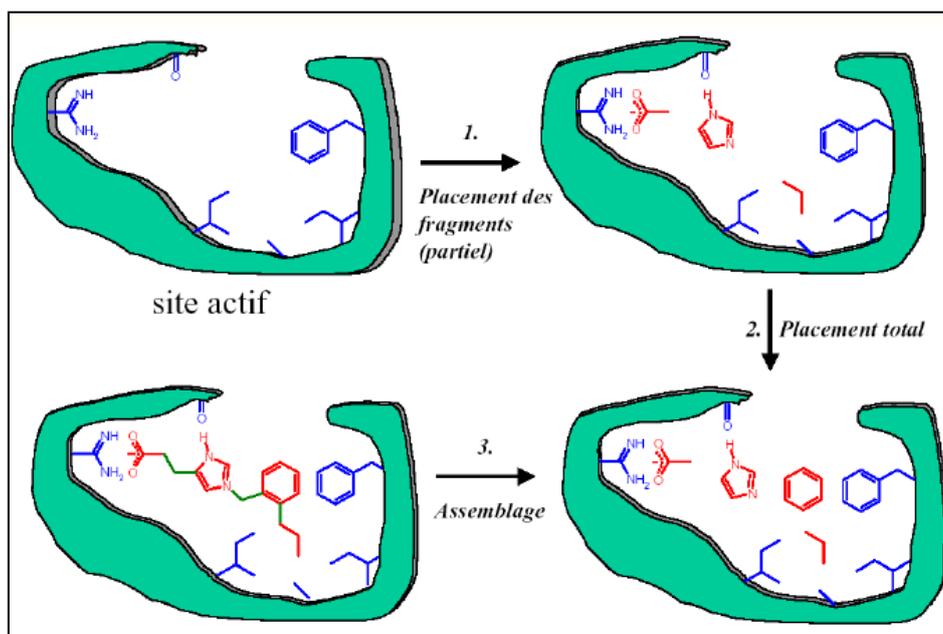


Figure 16. Représentation schématique des étapes de l'approche « conception *de novo* » (Magis, C. 2007)

2.4.2. Criblage virtuel « *Ligand-Based* »

Lorsqu'au moins un ligand ayant une activité sur la cible étudiée est connu, un criblage virtuel basé sur les ligands ou « *Ligand-Based* » peut être mis en œuvre. Cette démarche repose sur le principe que les molécules similaires vont avoir tendance à présenter des profils d'activité similaires (Koeppen, H. et *al* 2011). En effet, les ligands connus sont ainsi utilisés comme référence afin d'en dériver un pharmacophore qui définit un ensemble de points caractéristiques que doit posséder une molécule pour être active. Son élaboration passe tout d'abord par la sélection de composés actifs pour la cible en question. Un alignement des poses sélectionnées permet par la suite de déduire les points significatifs responsables de l'affinité avec le récepteur (Kutlushina, A. et *al* 2018). L'intérêt d'utiliser ce type de criblage est d'une part de pouvoir éliminer directement les molécules indésirables et donc d'économiser du temps de calcul. Cependant, une telle stratégie ne permet pas d'identifier de nouvelles classes de molécules actives dont les propriétés diffèreraient de celles des ligands actifs connus.

3. Évaluation des méthodes de criblage virtuel

Les programmes de criblage virtuel ont été conçus pour rechercher de façon objective, rapide et efficace les modes d'association récepteur-ligand les plus favorables. Cependant, les résultats obtenus ne sont que des prédictions et leur fiabilité peut parfois être mise en doute

(Empereur-Mot, C. 2017). Il est donc crucial lors de la mise en place d'un criblage d'établir un ensemble de procédures de contrôle pour évaluer sa performance et ainsi vérifier la validité des résultats obtenus (Elkaïm, J. 2011). Cette évaluation permet, de manière tout aussi importante, de guider les bioinformaticiens dans le choix de l'outil le mieux adapté pour réaliser un criblage virtuel sur une cible donnée. Dans ce contexte, les méthodes d'évaluation d'un criblage virtuel s'intéressent à deux critères principalement, la précision du positionnement (RMSD) et la capacité à discriminer les molécules actives (enrichissement) (Leach, A.R. et al 2006).

3.1. Précision du positionnement

Les structures cristallographiques protéine-ligand disponibles dans la PDB sont souvent utilisées afin d'évaluer la capacité d'un logiciel de docking moléculaire à repositionner correctement un ligand selon son mode de liaison expérimental. En effet, la précision d'une pose prédite peut être évaluée en calculant l'écart quadratique moyen ou RMSD (*Root Mean Square Deviation*). Cette mesure géométrique représente la moyenne des distances atomiques entre la pose prédite d'un ligand et sa conformation expérimentale (Équation 1) (Hawkins, P.C.D. et al 2008).

$$RMSD(A, B) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n ((A_{ix} - B_{ix})^2 + (A_{iy} - B_{iy})^2 + (A_{iz} - B_{iz})^2)}$$

Équation 1. Formule du RMSD entre deux composés A et B (x, y et z : coordonnées cartésiennes, n : nombre d'atomes du composé étudié. (Hawkins, P.C.D. et al 2008)

Pour réaliser un calcul de RMSD, le ligand co-cristallisé d'un complexe protéine-ligand donné est retiré puis repositionné par docking dans le site actif. Plus la valeur de RMSD est faible, plus la pose prédite est proche de celle du ligand co-cristallisé, plus la prédiction du positionnement est précise. Selon les travaux réalisés par Gabb J et al (Gabb, J. et al 1997), une simulation par docking moléculaire est jugée fiable si la valeur de RMSD est inférieure à 2 Å.

3.2. Enrichissement

Le deuxième critère d'évaluation dit « enrichissement » permet de vérifier la capacité d'un programme de docking à discriminer les molécules réellement actives des autres

molécules inactives. Dans cette optique, plusieurs banques sont à présent mises à disposition afin d'évaluer ce critère citons à titre d'exemple : *PubChem*, *Zinc* et *Directory of Useful Decoys Enchanced* (DUD-E). Ces banques d'évaluation répertorient plusieurs milliers de composés actifs sélectionnés à partir de données expérimentales validant leur activité envers différentes cibles. Le test de fiabilité par enrichissement consiste à cribler virtuellement une chimiothèque enrichie par des molécules actives. Dans un scénario idéal, le programme utilisé est jugé performant s'il est capable de différencier les composés actifs du reste des composés de la chimiothèque utilisée. Autrement dit, les meilleurs scores doivent être attribués aux composés actifs afin qu'ils se concentrent dans la première fraction du classement (figure 17) (Kirchmair, J. et al 2008).

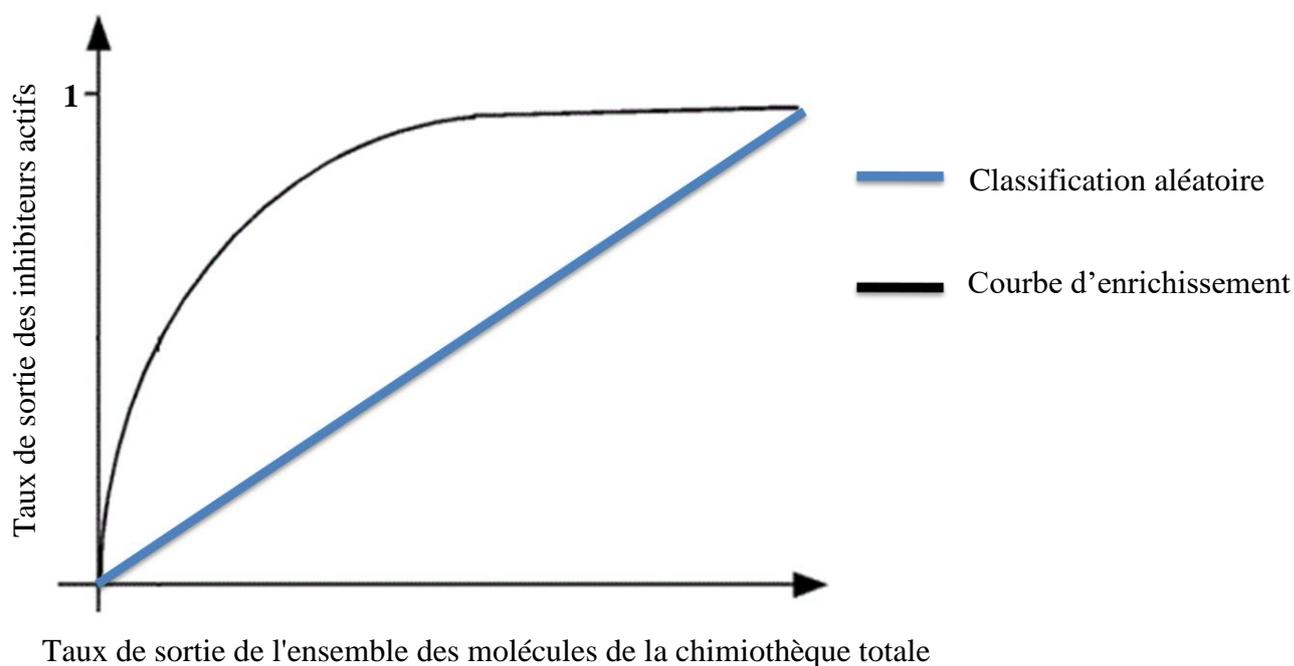


Figure 17. Courbe d'enrichissement (noir) représente l'évolution du taux des actifs en fonction du taux de sortie de la chimiothèque totale. Une classification aléatoire des composés de la chimiothèque est représentée par une diagonale bleue allant du point (0,0) au point (1,1) du graphique (*Random*) (Arrault, A. 2007)

4. Consensus scoring

Malgré l'existence d'un grand nombre de programmes de docking, aucun ne peut être appliquée de façon générale sur la totalité des systèmes biologiques car chacun présente des avantages mais également des imperfections (Huang, S. et al 2010). Ainsi, l'utilisation de plusieurs programmes de docking suivie par l'application d'une méthode consensus est

recommandée pour combiner et tirer le meilleur profit de plusieurs logiciels de docking utilisés dans le cadre d'une même étude. Autrement dit, cette approche permet de combiner les informations issues de différentes fonctions de score afin de compenser leurs imperfections individuelles ce qui améliore la qualité des résultats obtenus. L'hypothèse sous-jacente est que la probabilité qu'une molécule soit active doit augmenter si cette dernière est associée à de bons scores d'affinité selon plusieurs fonctions de score. De même, la probabilité qu'une molécule fautive/positive soit bien classée doit diminuer car, avec leurs fonctions de score différentes, les logiciels ont peu de chance de commettre la même erreur (Chaput, L. et al 2016).

5. Succès du criblage virtuel

En regard des références bibliographiques énoncées dans le domaine de *drug design*, plusieurs études ont montré l'intérêt du criblage virtuel en permettant de rationaliser et amorcer ce processus. Dans cette optique, un livre édité par Wiley-VCH en 2011 est entièrement consacré au criblage virtuel, et tout un chapitre est dédié aux succès de cette approche. Il regroupe environ 150 publications qui font état de divers projets dans lesquelles ces méthodes ont permis la découverte de nouveaux inhibiteurs pour de très nombreuses cibles thérapeutiques (Koeppen, H. et al 2011). Ainsi, de très nombreux exemples de réussite de criblages virtuels sont disponibles dans la littérature scientifique. Le tableau 1 récence 31 exemples de médicaments commercialisés entre 1995 et 2009 pour lesquels le criblage virtuel, qu'ils soient « *Structure-Based* » et/ou « *Ligand-Based* », a joué un rôle crucial.

Tableau 1. Quelques exemples de médicaments mis sur le marché pour lesquels la mise en œuvre de criblages virtuels a joué un rôle important.

Nom du principe actif	Cible	indication	Référence
Dorzolamide	Anyhydrase carbonique	Glaucome	Baldwin, J.J. et al 1989
Saquinavir	Protéase du VIH	SIDA	Roberts, N.A. et al 1990
Ritonavir	Protéase du VIH	SIDA	Kempf, D. J. et al 1998
Indinavir	Protéase du VIH	SIDA	Dorsey, B.D. et

			<i>al</i> 1994
Brinzolamide	Anyhdrase carbonique	Glaucome	Silver, L.H. 2000
Nelfinavir	Protéase du VIH	SIDA	Kaldor, S.W. et <i>al</i> 1997
Amprenavir	Protéase du VIH	SIDA	Kim, E.E. et <i>al</i> 2004
Lopinavir	Protéase du VIH	SIDA	Sham, H.L. et <i>al</i> 1998
Zanamivir	Neuraminidase	Grippe	von Itzstein, M. et <i>al</i> 1993
Oseltamivir	Neuraminidase	Grippe	Kim, C.U. et <i>al</i> 1998
Imatinib	Kinase BCR-ABL	Leucémie myéloïde chronique	Zimmermann, J. et <i>al</i> 1997
Gefitinib	EGFR	Cancer du poumon à grandes cellules	Hennequin, L. F. et <i>al</i> 1999
Atazanavir	Protéase du VIH	SIDA	Robinson, B.S. et <i>al</i> 2000
Fosamprenavir	Protéase du VIH	SIDA	Becker, S. et <i>al</i> 2004
Erlotinib	EGFR	Cancer du poumon à grandes cellules	Pollack, V.A. et <i>al</i> 1999
Sorafenib	VEGFR	Cancer du rein	Wilhelm, S.M. et <i>al</i> 2004
Tipranavir	Protéase du VIH	SIDA	Turner, S.R. et <i>al</i> 1998
Udenafil	Phosphodiesterase 5	Dysfonctionnements érectiles	Ahn, B.O. et <i>al</i> 2003
Sunitinib	Kinases variées	Cancer du rein	Mendel, D.B. et <i>al</i> 2003
Darunavir	Protéase du VIH	SIDA	Ghosh, A.K. et <i>al</i> 2007

Vorinostat	Histone désacétylase	Lymphome T cutané	Kelly, W.K. et <i>al</i> 2005
Dasatinib	Tyrosine kinases variées	Leucémie myéloïde chronique	Lombardo, L.J. et <i>al</i> 2004
Nilotinib	Kinase BCR-ABL	Leucémie myéloïde chronique	Weisberg, E. et <i>al</i> 2005
Aliskiren	Rénine	Hypertension artérielle	Rahuel, J. et <i>al</i> 2000
Lapatinib	Kinases variées	Cancer du sein	Rusnak, D.W. et <i>al</i> 2001
Rivaroxaban	Facteur X	Thromboses veineuses	Roehrig, S. et <i>al</i> 2005
Dabigatran	Thrombine	Thromboses veineuses	Sorbera, L.A. et <i>al</i> 2005
Etravirine	Transcriptase inverse	SIDA	Das, K. et <i>al</i> 2004
Pazopanib	Kinases variées	Cancer des ovaires	Sleijfer, S. et <i>al</i> 2009
Ximelagatran	Thrombine	Embolie veineuse	Gustafsson, D. et <i>al</i> 2004
Boceprevir	protéase HCV	Hépatite C	Njoroge, F.G. et <i>al</i> 2008

L'exemple le plus lumineux est celui du gefitinib (figure 18). Il s'agit du premier médicament mis sur le marché pour traiter les cancers métastatiques du poumon à grandes cellules. Ce composé a été développé puis commercialisé en 2009 par AstraZeneca & Teva sous le nom « Iressa® ». Il est à souligner que les approches par criblage virtuel « *Ligand-Based* » ont notamment contribué à la conception de ce médicament (Herbst, R.S. et *al* 2004).

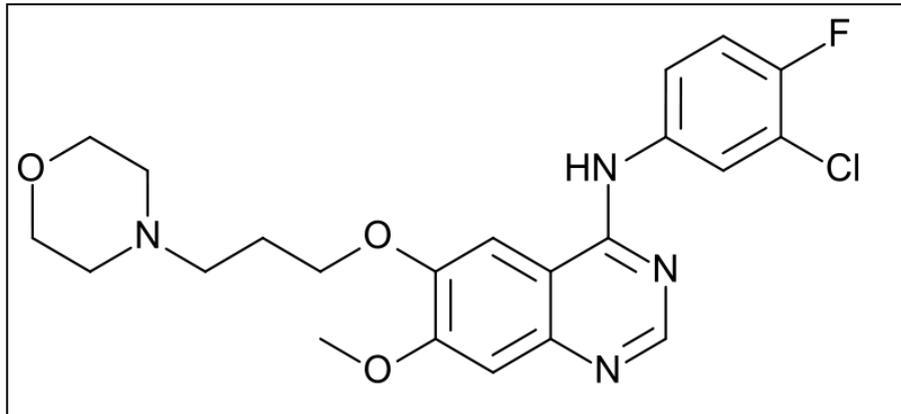


Figure 18. Structure chimique du gefitinib

Partie

Pratique

Matériel
et
Méthodes

L'objectif principal de notre travail est de développer de nouveaux inhibiteurs de l'AChE en faisant appel à une stratégie rationnelle reposant sur la combinaison de deux méthodes différentes dont l'une est virtuelle et l'autre expérimentale. La première dite *in silico* est utilisée en premier lieu afin de prédire l'affinité, les propriétés physicochimiques, pharmacocinétiques ainsi que la toxicité potentielle des molécules que retiendra l'opération de criblage virtuel de la chimiothèque de Curie. Quant à la deuxième méthode qui vient en second lieu servira à évaluer expérimentalement *in vitro* voire *in vivo* respectivement l'activité anti-AChE et la toxicité potentielle des molécules provenant de ce criblage virtuel.

1. Criblage virtuel

Le criblage virtuel est une étape préliminaire et déterminante pour la partie expérimentale qui suivra dans ce travail. Le criblage virtuel a pour but principal de sélectionner, sur la base de leur affinité, les molécules de la chimiothèque de Curie potentiellement capables d'inhiber fortement l'activité de l'AChE ; une des enzymes clés de la MA. Pour ce faire, différentes étapes préparatoires nécessaires ont été mises en œuvre.

1.1. Préparation de l'enzyme

1.1.1. Choix de la structure cristallographique

La structure de l'enzyme AChE, objet de notre étude, provient de la *Protein Data Bank* (PDB) qui représente la principale source de protéines existantes pour la plupart sous forme de complexes cristallographiques 3D de type protéine-ligand. Parmi les nombreux complexes de l'enzyme qu'offre la banque, nous nous sommes limités à six d'entre eux car hautement définis avec une résolution inférieure à 2.5 Å qui fut notre premier critère de choix (tableau 2).

L'autre critère également de grande importance qui a guidé notre choix est l'ouverture de la cavité catalytique de l'enzyme. L'alignement 3D réalisé à l'aide du programme VMD version 1.9.1 (Humphrey, W. et *al* 1996), révèle une nette superposition des résidus d'acides aminés des six structures du tableau 2 témoignant d'un même degré d'ouverture de leur cavité catalytique (figure 19).

Tableau 2. Principales caractéristiques des six complexes protéine-ligand de l'AChE humaine.

Code PDB	Résolution (Å)	Nombre de chaînes	Nombre d'acides aminés	Code de l'inhibiteur	Référence bibliographique
5HF5	2.15	2	1084	DEP	Franklin, M.F. et <i>al</i> 2016
5HF6	2.3	2	1084	EFS	Franklin, M.F. et <i>al</i> 2016
5HF9	2.2	2	1084	HI6	Franklin, M.F. et <i>al</i> 2016
5HFA	2.2	2	1084	FP1	Franklin, M.F. et <i>al</i> 2016
4M0E	2.0	2	1084	1YL	Cheung, J. et <i>al</i> 2013
4M0F	2.3	2	1084	1YK	Cheung, J. et <i>al</i> 2013

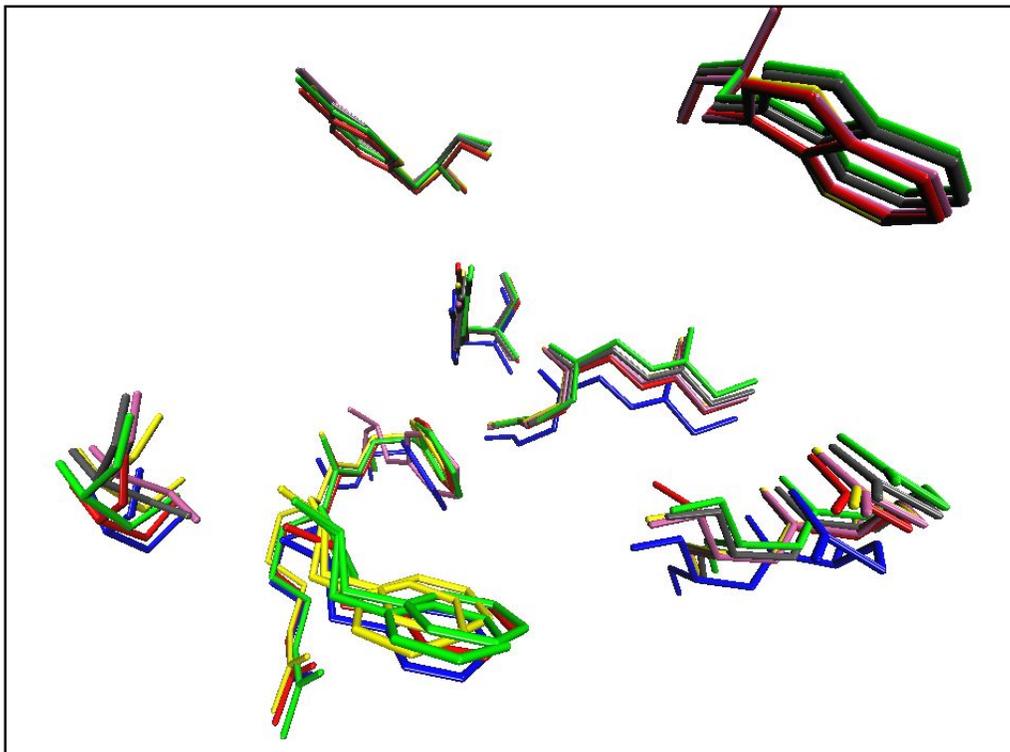


Figure 19. Alignement 3D des résidus d'acides aminés de la cavité catalytique des 6 structures cristallographiques de l'AChE humaine (**4M0E** en bleu, **4M0F** en rouge, **5HFA** en jaune, **5HF9** en vert, **5HF6** en gris et **5HF5** en mauve).

C'est sur la base de ces deux critères que notre choix s'est fixé sur le complexe **4M0E** dont la structure se distingue, comme le montre le tableau 2, par une meilleure résolution de ses atomes.

1.1.2. Adaptation du fichier de l'enzyme au criblage virtuel

Pour une bonne réussite du criblage virtuel, il est nécessaire de procéder à une simplification préalable du fichier original de l'enzyme. Le complexe **4M0E** étant sous forme homodimérique, en faisant appel au programme VMD, nous avons éliminé la chaîne B et gardé uniquement la chaîne A. Les molécules d'eau ont aussi été supprimées sauf quatre faisant partie de la cavité catalytique de l'enzyme. L'inhibiteur **1YL** (dihydotanshinone I) complexant l'enzyme ainsi que les éléments ou hétéroatomes ayant servi à la cristallisation tels que les ions nitrates, l'alpha-l-fucose, le 1,2-éthanediol et le N-Acétyl-D-glucosamine ont également été retirés (figure 20).

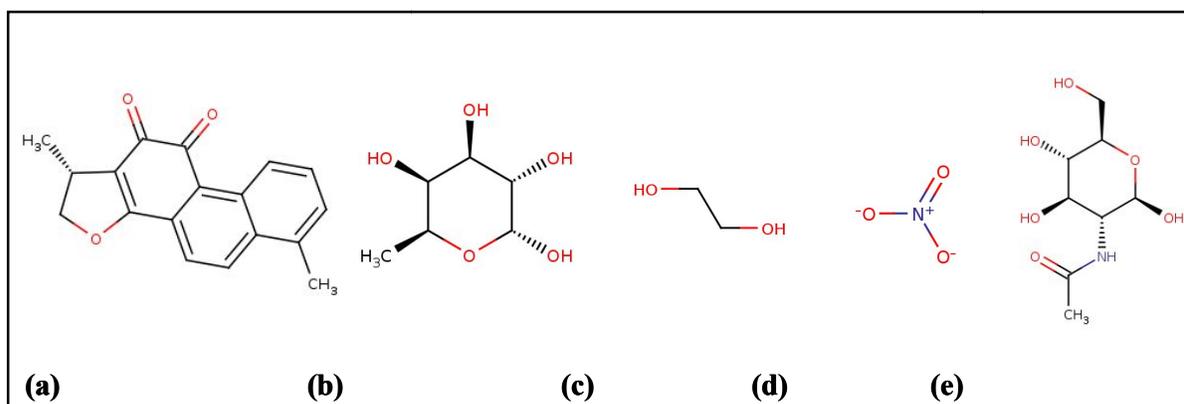


Figure 20. Structure des ligands existants dans le complexe **4M0E** de l'enzyme AChE. **(a)** dihydotanshinone I, **(b)** alpha-l-fucose, **(c)** 1,2-éthanediol, **(d)** ions nitrates et **(e)** N-acétyl-D-glucosamine.

En revanche, les hydrogènes manquants à la structure de l'enzyme ont été rajoutés grâce au script « *Protein Preparation Wizard* » du programme Maestro version 11.3 (<https://www.schrodinger.com/maestro>). Ce même programme nous a aussi servi à corriger les états de protonation et de déprotonation des différents résidus d'acides aminés de l'enzyme, notamment ceux de la triade catalytique, favorisant l'interaction entre l'enzyme et le substrat en milieu biologique. L'hydroxyle radicalaire du résidu Ser203 a été orienté vers l'azote du résidu His447 que nous avons également déprotoné tel que cité par les travaux de

Dvir, H. et *al* 2010 (figure 21). Enfin, l'énergie intramoléculaire de l'enzyme a été minimisée afin de corriger les éventuelles anomalies de longueurs de liaisons et d'angles de torsion. Le fichier ainsi préparé est enregistré sous le format .mol2 requis par les programmes de criblage virtuel utilisés.

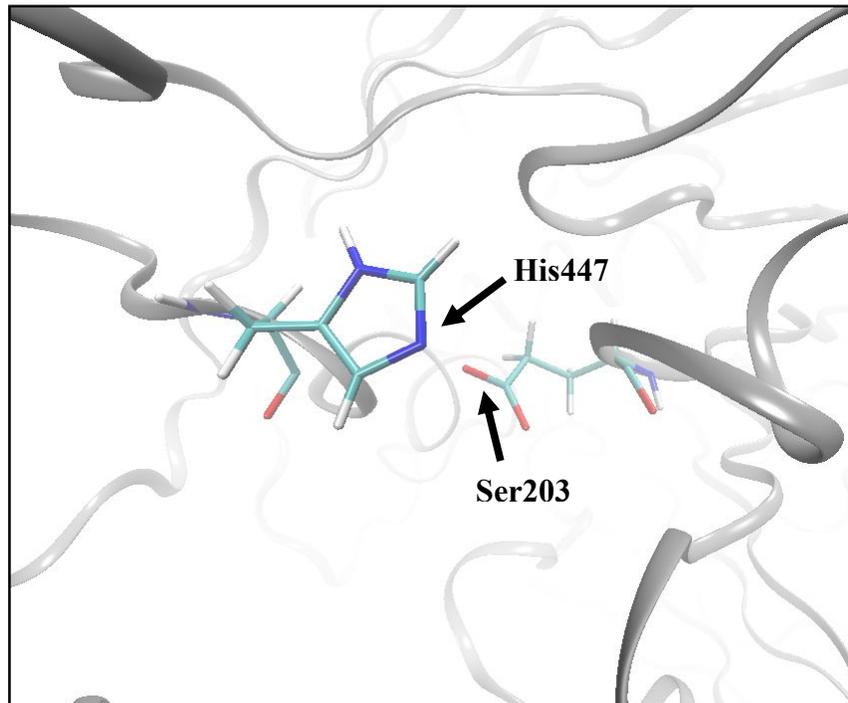


Figure 21. Préparation de la triade catalytique de l'ACHé.

1.1.3. Définition de la cavité catalytique de l'enzyme

En règle générale, le site actif de l'enzyme correspond au site de liaison de l'inhibiteur co-cristallisé existant dans le complexe de la PDB. Dans le cas de l'ACHé, la cavité catalytique a été définie à l'aide du programme VMD en sélectionnant tous les résidus d'acides aminés se trouvant à proximité de l'inhibiteur originel **1YL** à des distances n'excédant pas 6 Å (Chaput, L. et *al* 2016). Cette méthode nous a permis de retrouver tous les résidus d'acides aminés déjà cités par la littérature (Gerlits, O. et *al* 2019, Kwasnieski, O. 2010, Johnson, G. et *al* 2006, Colletier, J.P. et *al* 2006, Barak, D. et *al* 2002), des deux sites catalytique (CAS) et périphérique (PAS) de la cavité catalytique de l'ACHé (figure 22) qui sont répartis comme suit :

-CAS : Trp86, Gly120, Gly121, Gly122, Tyr133, Glu202, Ser203, Phe295, Arg296, Phe297, Glu334, Tyr337, Phe338, His447, Gly448, Gly449 et Ile451.

-PAS : Tyr72, Asp74, Tyr124, Ser125, Trp286, Leu289, Glu292, Ser293, Val294, Tyr341 et Gly342.

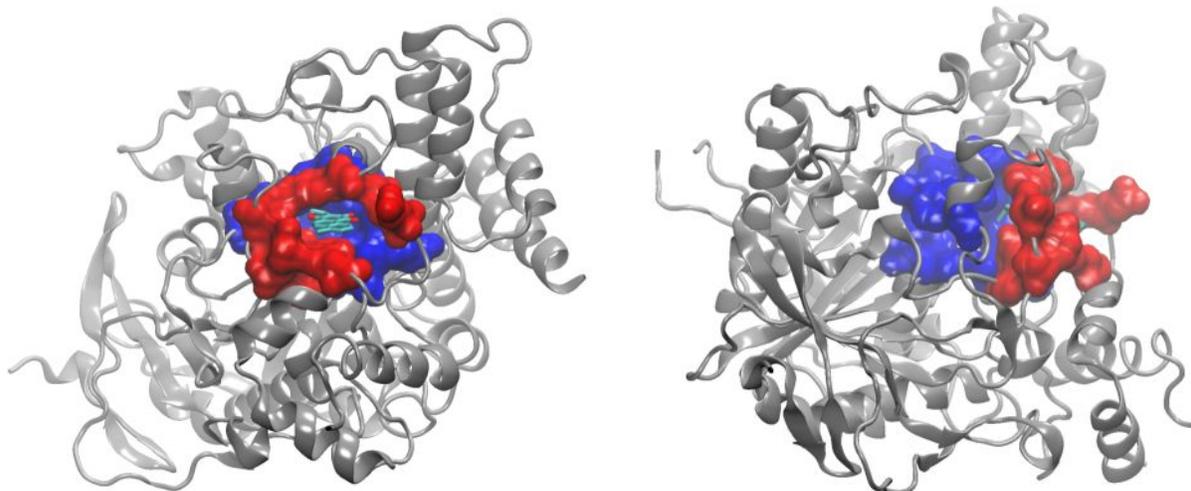


Figure 22. Vue de face (à gauche) et de profil (à droite) de la structure cristallographique de l'AChE humaine (code PDB : **4M0E**) en complexe avec son inhibiteur (**1YL**). La structure secondaire de l'enzyme est représentée en mode « cartoon » en gris tandis que le CAS (en bleu) et le PAS (en rouge) sont représentés en mode « surface ».

Le contenu de ces deux sites est ensuite reporté dans un fichier texte puis enregistré au format que requiert chacun des programmes de docking moléculaire utilisé pour le criblage virtuel (annexe 1).

1.2. Préparation de la chimiothèque

1.2.1. Nettoyage de la chimiothèque

Pour réaliser le criblage virtuel, nous avons fait appel à la chimiothèque de l'Institut Curie qui compte 15163 composés (<https://science.institut-curie.org/platforms/chemical-library>). Pour augmenter nos chances de réussite du criblage virtuel, nous avons utilisé le script « *LigPrep* » du programme Schrödinger (<https://www.schrodinger.com>) afin de repérer et d'éliminer tous les composés de la chimiothèque dont le poids moléculaire dépasse 750 g/mol ou disposant de moins de 10 atomes de carbones ou encore ceux capables de chélater des ions ou des atomes lourds (Fe²⁺, Mg²⁺, Au, Cu, Hg, I, Sn...etc.). Cette opération de nettoyage nous a permis d'éliminer 856 composés de la chimiothèque qui compte maintenant

14307 composés dont ceux susceptibles de présenter une forte activité inhibitrice de l'AChE voire un bon potentiel de candidat médicament (Chaput, L et *al* 2016).

1.2.2. Enrichissement de la chimiothèque

Un des éléments clés de la réussite du criblage virtuel est la performance des programmes de docking moléculaire qu'il est nécessaire de vérifier. À ce titre, nous avons enrichi la chimiothèque de Curie par 451 composés dont la galantamine que nous avons choisi comme référence. Ces composés proviennent d'une banque de données d'évaluation connue sous le nom de Database of Useful Decoys-Enhanced (DUD-E) (<http://dude.docking.org/>) qui comprend plusieurs milliers de molécules expérimentalement actives sur plus d'une centaine de cibles thérapeutiques y compris l'AChE qui nous intéresse dans cette étude. À ce stade, la chimiothèque enrichie compte 14758 molécules. En faisant appel au logiciel Gnuplot version 5.2 (<http://www.gnuplot.info/>), nous avons pu tracer la courbe d'enrichissement de chaque programme de docking moléculaire permettant d'exprimer sa capacité de discrimination des molécules actives de la DUD-E par rapport aux autres molécules de la chimiothèque.

1.2.3. Génération des tautomères, formes ionisées et optimisation de la géométrie.

Une autre étape importante de la préparation de la chimiothèque de Curie consiste à générer, à l'aide du script « *LigPrep* » de Schrödinger, les différents états possibles de tautomérie et d'ionisation (figure 23) des composés de cette dernière au pH physiologique 7.4 ± 1 (Chaput, L. et *al* 2017).

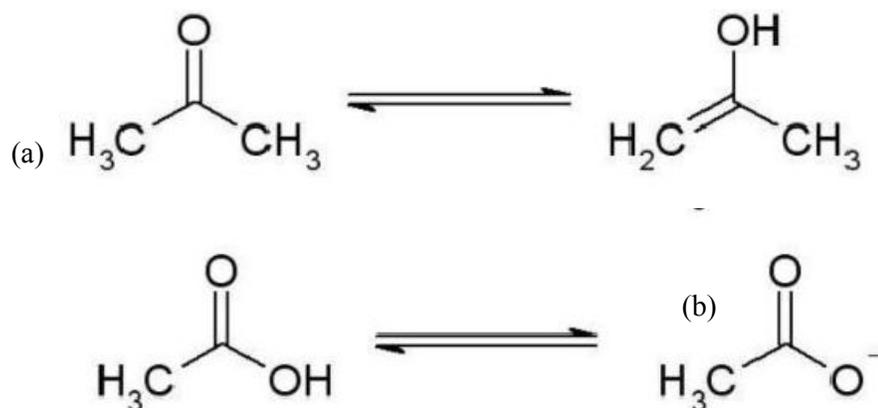


Figure 23. Exemple de la variation de l'état chimique des molécules : **(a)** formes tautomères (transfert intramoléculaire de proton) ; **(b)** états d'ionisation (perte de proton) (Empereur-Mot, C. 2017).

Il est important de souligner que chaque état d'ionisation ou de tautomérisation est considéré comme composé à part faisant atteindre le nombre total de la chimiothèque à 25260 composés. Enfin, la géométrie de chaque composé est optimisée par minimisation de l'énergie intramoléculaire grâce au champ de force « *mmod-search* » de Schrödinger et les résultats sont exportés et enregistrés dans des fichiers au format .mol2 et .sdf.

1.3. Protocole du criblage virtuel « *Structure-Based* »

Le criblage virtuel basé sur la structure de l'enzyme, ou « *Structure-Based Virtual Screening* » (SBVS) en termes anglo-saxon, a été réalisé dans le but de dégager une liste restreinte d'inhibiteurs potentiellement actifs à l'égard de l'AChE à partir des 25260 composés formant la chimiothèque préalablement préparée. Pour ce faire, nous avons fait appel à quatre programmes de docking moléculaire parmi les plus utilisés dans le domaine du SBVS à savoir: Gold (Jones, G. et *al* 1995), Glide (Halgren, T.A. et *al* 2004), Surflex (Jain, A.N. 2003) et FlexX (Rarey, M. et *al* 1996). Le choix de ces programmes a été particulièrement dicté par la variabilité et la différence de leurs algorithmes de recherche et leurs fonctions de score (Chaput, L. et *al*. 2016). Pour tous les programmes, nous avons utilisé le docking semi-flexible qui tient compte de la flexibilité du ligand ou inhibiteur mais considère la cible ou l'enzyme comme corps rigide. Le criblage virtuel « *Structure-Based* » a été réalisé à l'aide d'un cluster de calcul très puissant de 640 CPU sous le système d'exploitation Linux qui offre, par rapport au système Windows, un double avantage en protégeant les données face aux virus et en accélérant le temps de calcul.

1.3.1. Glide version 6.3

Ce premier programme utilise une boîte 3D (*GridBox*) limitant et englobant largement le site actif de l'AChE préalablement préparée (figure 24). Les coordonnées spatiales $X=10.869$, $Y=-9.290$ et $Z=9.489$ déterminent le centre de la boîte dont les dimensions sont proportionnelles à la taille de l'inhibiteur originel permettant sa libre rotation dans le site actif de l'enzyme. Les calculs du SBVS sont réalisés avec les paramètres par défaut de l'algorithme de recherche *Glide Standard Precision* (SP). Les poses résultantes sont évaluées et classées en fonction du score (ΔG en kcal/mol) généré par la fonction *GlideScore* du programme utilisé.

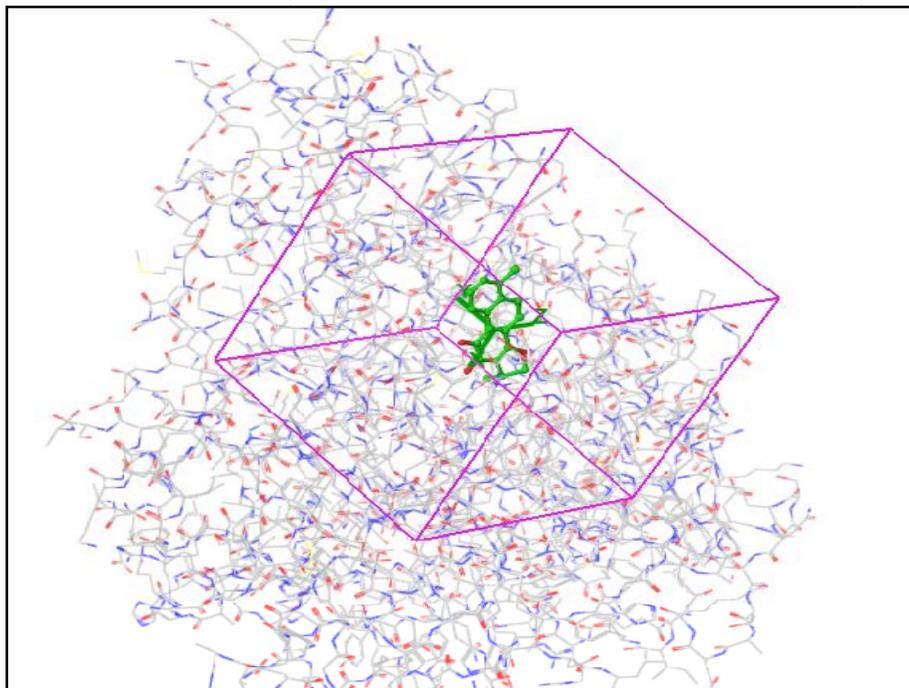


Figure 24. Positionnement de la boîte 3D ou « GridBox » dans le site actif de l'AChE (Code PDB : 4M0E). Le ligand de référence 1YL est représenté en « Stick » vert. Les résidus acides aminés de la protéine sont représentés en « Lines ». Le cube violet correspond à la zone de recherche du criblage virtuel.

1.3.2. Gold version 5.2.2

Ce deuxième programme repose sur un algorithme génétique très efficace permettant l'exploration d'un nombre important de conformations du ligand au sein du récepteur. Dans notre cas, les paramètres par défaut de l'algorithme génétique de Gold ont été conservés (voir annexe 2). Le classement des poses est généré par une fonction de score dite « *GoldScore* » sans unité.

1.3.3. Surflex version 2.745

Ce troisième programme dispose d'un algorithme de fragmentation incrémentale appelé « algorithme de Hammerhead ». Ce dernier utilise trois types de fragments (CH₄, C=O et N-H) qu'il place dans le site actif sous différentes positions et qu'il évalue au fur et à mesure. Les fragments les mieux scorés sont aussitôt assemblés pour former une pseudo molécule idéale appelée « *protomol* » qui couvre l'intégralité du site actif. Dans le cas de l'AChE, le *protomol* a été généré à partir de la liste des résidus du site actif préalablement préparée (voir annexe 1). Deux paramètres importants du programme ont été utilisés par défaut pour

contrôler le volume et l'étendue du *protomol* dans le site actif de l'enzyme. Le premier paramètre appelé *proto_thresh* de valeur 0.5 définit le volume principal du *protomol* à générer. Plus la valeur du *proto_thresh* diminue plus le volume du *protomol* augmente et vice versa. Le deuxième paramètre appelé *proto_bloat* de valeur 2Å permet de contrôler la distance d'extension (en Angströms) du *protomol* par rapport à son volume principal. Cette étape d'ajustement du *protomol* a été réalisée par la commande suivante :

```
surfex-dock -proto_thresh 0.5 -proto_bloat 2 resproto liste_residus_AChE.txt  
protéine.mol2 pl
```

Avant le lancement des calculs, il est conseillé de visualiser d'abord le *protomol* avec le ligand originel de référence pour s'assurer que son volume et son extension sont convenablement ajustés au site actif de l'enzyme étudiée (figure 25).

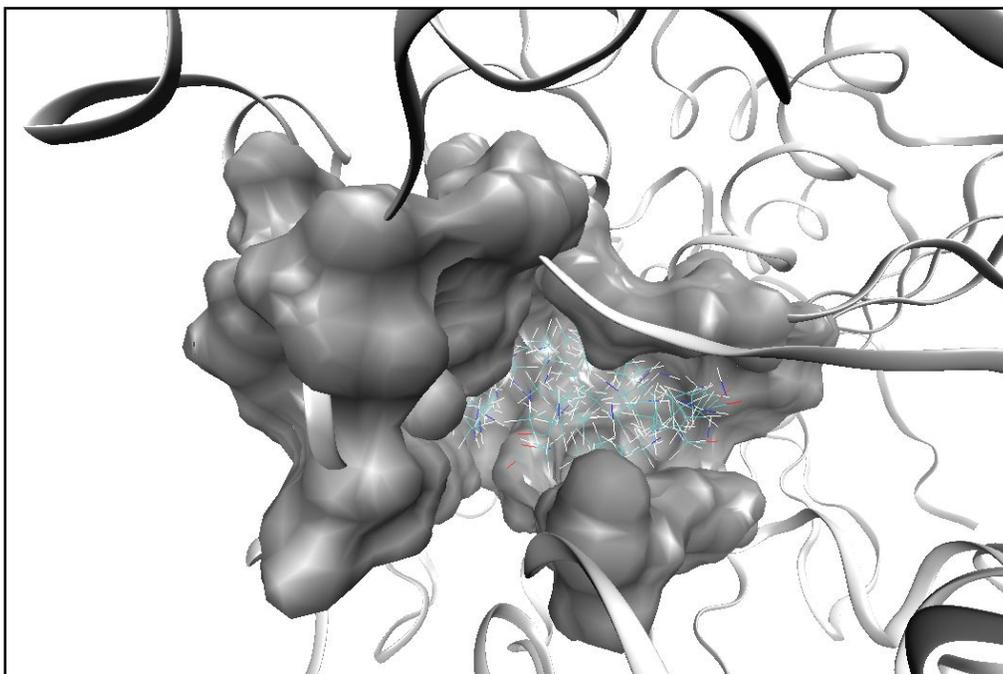


Figure 25. Représentation du *Protomol* représenté par types d'atomes en mode « Lines » dans le site actif de l'AChE représenté en gris en mode « Surf ».

Le mode de fonctionnement de Surfex est basé sur la fragmentation du ligand en parties rigides et en liaisons flexibles. Le ligand est reconstruit en plaçant d'abord les parties rigides

puis en rajoutant de proche en proche les liaisons flexibles en explorant différentes conformations dans le site actif. La commande **dock-list** dont dispose le programme présente l'avantage de réaliser le criblage virtuel d'une longue liste de molécules allant d'une dizaine à plusieurs centaines de molécules. Dans notre cas, nous avons réparti les 25260 composés de la chimiothèque de Curie en 60 listes contenant chacune 421 composés. L'intérêt d'une telle répartition est de réduire le temps de calcul et de faciliter le traitement des résultats à la fin du criblage (voir annexe 3). Le paramètre **soft_box** a également été appliqué pour pénaliser par diminution du score les ligands qui ont tendance à se lier à l'extérieur de la cavité. Pour les calculs de docking moléculaire, nous avons utilisé le mode "pgeomx" qui est fortement recommandé pour le criblage d'une collection de molécules de l'ampleur de la chimiothèque de Curie.

Le docking moléculaire avec Surfex s'effectue grâce à la commande suivante :

```
surfex-dock -pgeomx +frag +soft_box dock_list list_molécules.txt p1-protomol.mol2
protéine.mol2
```

La fonction de score du programme Surfex évalue et classe les poses du ligand selon leur affinité exprimée par le logarithme décimal négatif de la constante de dissociation ou pK_d (<http://www.biopharmics.com>).

1.3.4. FlexX version 2.1.5

Il s'agit du dernier programme utilisé dans ce travail. C'est un programme avec un temps d'exécution très rapide, basé comme Surfex sur l'approche par fragmentation suivie d'une construction incrémentale du ligand au sein du site actif. Le facteur limitant du programme réside dans le choix du fragment de base servant à la reconstruction du ligand. Son emplacement conditionne l'exploration de l'espace conformationnel de la molécule. Dans notre étude, les paramètres contrôlant la sélection et l'emplacement des fragments ont été appliqués selon leur configuration par défaut (voir annexe 4). Les différentes poses du ligand (inhibiteur) dans le site actif de l'enzyme sont évaluées et classifiées sur la base de la variation de leur énergie libre (ΔG en kJ/mol) calculée par la fonction de score de Böhm suivante :

$$\begin{aligned}
 \Delta G &= \Delta G_0 + \Delta G_{rot} \times N_{rot} \\
 &+ \Delta G_{hb} \sum_{\text{ponts-H}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \\
 &+ \Delta G_{io} \sum_{\text{int-ionic}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \\
 &+ \Delta G_{aro} \sum_{\text{int-aro}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \\
 &+ \Delta G_{lipo} \sum_{\text{cont-lipo}} f^*(\Delta R)
 \end{aligned}$$

Équation 2. Fonction de score du programme FlexX

ΔG : variation d'énergie libre globale du complexe.

ΔG_0 : entropie conformationnelle du ligand.

ΔG_{rot} : perte d'entropie du ligand lors de la complexation au récepteur. Il est basé sur le nombre de liaisons acycliques libres du ligand.

ΔG_{hb} , ΔG_{io} et ΔG_{aro} : contributions des groupes d'interactions appariés comme les liaisons hydrogènes, les ponts salins et les interactions aromatiques.

$f(\Delta R, \Delta \alpha)$: fonction de pénalité qui sert à mesurer la déviation de la distance et de l'angle de liaison.

ΔG_{lipo} : taux de contacts atome-atome dans les interactions hydrophobes entre la protéine et le ligand.

1.4. Traitement des fichiers de sortie (*output*)

Pour prédire leur affinité, les composés de la chimiothèque adoptent, lors du criblage virtuel, différentes conformations et positions au sein du site actif de l'enzyme. Pour chaque composé, seul un nombre déterminé de conformations correspondant aux meilleurs scores est sauvegardé par le logiciel. Les programmes Gold, Glide et FlexX génèrent, pour chaque composé étudié, les 10 meilleures positions alors que Surflex en génère le double. Les résultats de chaque programme sont générés dans un fichier *output* où figure par classement, le nom de la molécule, le score, le numéro de la pose ainsi que d'autres annotations. À titre d'exemple, Surflex génère un fichier *output* avec 505 200 poses à raison de 20 poses pour chaque molécule de la chimiothèque qui, rappelons-le, en compte 25260 composés (Annexe 5). Par conséquent il nous a semblé judicieux de simplifier le fichier par traitement informatique où pour chaque molécule de la chimiothèque ne sera retenu qu'un seul score celui correspondant à la meilleure pose. Le nouveau fichier texte comportera deux colonnes dont la première correspond au classement par ordre décroissant des scores retenus des différentes molécules et la deuxième aux identifiants de ces molécules dans la chimiothèque de Curie (Annexe 6).

1.5. La méthode dite *variable Standard Deviation Consensus* (vSDC)

Disposant de fonctions de scores et d'algorithmes de positionnement différents, les programmes de docking moléculaire utilisés en vue d'un criblage virtuel basé sur la structure (SBVS) peuvent ne pas générer les mêmes résultats et encore moins les mêmes erreurs de classement. À ce titre, il est recommandé dans les études de SBVS d'associer aux programmes de docking moléculaire, une méthode dite consensus dont l'intérêt est de tirer le meilleur profit de chaque logiciel et de compenser leurs imperfections en réduisant tant que possible le nombre de composés faux-positifs pouvant être générés par ces programmes dans les premières portions du classement.

Dans notre travail, nous avons fait appel à la méthode dite *variable Standard Deviation Consensus* (vSDC) préconisée par Chaput, L. et *al* (2016). Cette méthode a pour but de générer un nouveau classement des molécules sur la base de leur classement initial. Pour ce faire, un fichier texte d'entrée (*input*) permettant le lancement de l'application vSDC est créé à l'aide du programme R (<https://www.r-project.org/>). Ce fichier comporte quatre colonnes dont la première correspond aux noms ou numéros des composés provenant du criblage virtuel et les trois autres correspondent aux scores de chaque composé, calculés respectivement par les trois programmes Glide, Surflex et Gold (Annexe 7). FlexX étant le programme le moins fiable n'a pas été retenu dans cette étude. Le fichier de sortie (*output*) que génère vSDC comprend, en plus des données du fichier d'entrée de départ (*input*), deux nouvelles colonnes inhérentes au reclassement des molécules par ordre décroissant en fonction des nouveaux scores calculés par vSDC (Annexe 8). Pour faciliter l'exploitation de ce fichier nous avons, parmi les différentes formes tautomères et ionisées de chaque composé, éliminé les mauvais résultats et gardé uniquement celui correspondant au meilleur score (Annexe 9). À partir de ce fichier, nous avons créé un autre fichier sans les molécules de la DUD-E (Annexe 10).

1.6. Inspection visuelle et sélection des composés à expérimenter

Si le criblage virtuel est certes une approche rapide de découverte, parmi plusieurs milliers de molécules de la chimiothèque de Curie, celles susceptibles d'être potentiellement actives à l'égard de l'ACHE, il reste cependant l'éventualité à ne pas écarter d'une sélection en même temps de composés dits faux/positifs qui peuvent également occuper un bon classement. À ce titre, l'exemple à citer est celui des résultats biaisés bien connus, générés par

le bon classement des ligands de poids moléculaire élevé qui, en raison d'un nombre d'atomes important, sont tout simplement capables de créer un plus grand nombre d'interactions même à l'entrée de la cavité catalytique de l'enzyme. Seule une analyse visuelle minutieuse du mode de positionnement et d'interaction dans le site actif de l'enzyme, des molécules présentant les meilleurs scores, est capable de déceler et d'écarter ce type de composés s'ils figurent dans les premières portions du classement généré par vSDC.

Pour ce faire, nous avons d'abord éliminé les 451 composés actifs connus de la DUD-E à l'exception de la galantamine qui nous a servis d'inhibiteur de référence. L'analyse visuelle fut menée dans un premier temps par les deux programmes de visualisation PyMol version 2.2.3 (<https://pymol.org>) et VMD version 1.9.1 (Humphrey, W. et *al* 1996), pour d'abord déterminer le mode de positionnement des molécules dans le site actif de l'AChE en comparaison avec l'inhibiteur de référence, la galantamine qui existe en complexe avec l'enzyme dans la PDB sous le code **4EY6**. La complémentarité de surface entre ces molécules et le site actif a également été prise en compte. Seuls, les composés couvrant l'intégralité de la cavité catalytique constituée des deux sites CAS et PAS ont été retenus. Dans un deuxième temps, le programme Maestro version 11.3 (<https://www.schrodinger.com/maestro>) a été utilisé pour mettre en évidence les interactions de types ioniques, hydrophobiques, π - π , π -cation et les liaisons hydrogène que ces composés peuvent mettre en jeu avec le site actif de l'enzyme, notamment avec la triade catalytique Ser203, Glu334 et His447.

Les premières molécules provenant du criblage virtuel au nombre de cent cinquante ont été préalablement réparties en différentes familles chimiques en fonction de la structure moléculaire de leur squelette de base. Seuls les composés, de chaque famille chimique, ayant présenté un mode de positionnement adéquat lors de l'analyse visuelle et physiquement et quantitativement disponibles au niveau de la chimiothèque de Curie ont été retenus en vue d'une analyse *in vitro* de leur activité inhibitrice à l'égard de l'AChE.

2. Evaluation *in vitro* de l'activité Anti-AChE

La structure et la pureté des molécules sélectionnées lors de l'étape visuelle précédente ont été analysées et vérifiées par les techniques LC-MS et RMN H^1 et ont été conservées dans le DMSO à une concentration de 2 mM avant leur évaluation expérimentale.

Concernant l'enzyme, nous avons choisi d'utiliser l'AChE de l'espèce marine *Electrophorus electricus* (Sigma, C2888) en raison surtout de sa disponibilité et de l'analogie

de structure de son site actif (code PDB **1C2B**) avec celui de l'AChE humaine (code PDB **4M0E**) que nous avons vérifié par la méthode d'alignement 3D avec le programme VMD (annexe 11).

L'activité anti-AChE de nos molécules a été évaluée par la méthode d'Ellman et *al* (1961), modifiée par Di Giovanna S et *al* (2008). Il s'agit d'une méthode colorimétrique standard permettant de quantifier l'inhibition de l'AChE par une évaluation de l'IC₅₀ qui correspond à la concentration nécessaire du produit capable de diminuer l'activité enzymatique de moitié. Expérimentalement, on utilise l'acétylcholine iodide (ATCI) comme substrat de cette enzyme à la place de l'acétylcholine (ACh). Le clivage de l'ATCI par l'AChE produit de la thiocholine (SCh) qui réagit alors à son tour avec le 5,5'-dithiobisnitrobenzoate (DTNB) pour former un composé anionique de couleur jaune : le 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB) qui absorbe à 412 nm. L'absorbance du TNB mesurée à l'aide du spectrophotomètre est proportionnelle à l'activité enzymatique de l'AChE (Figure 26).

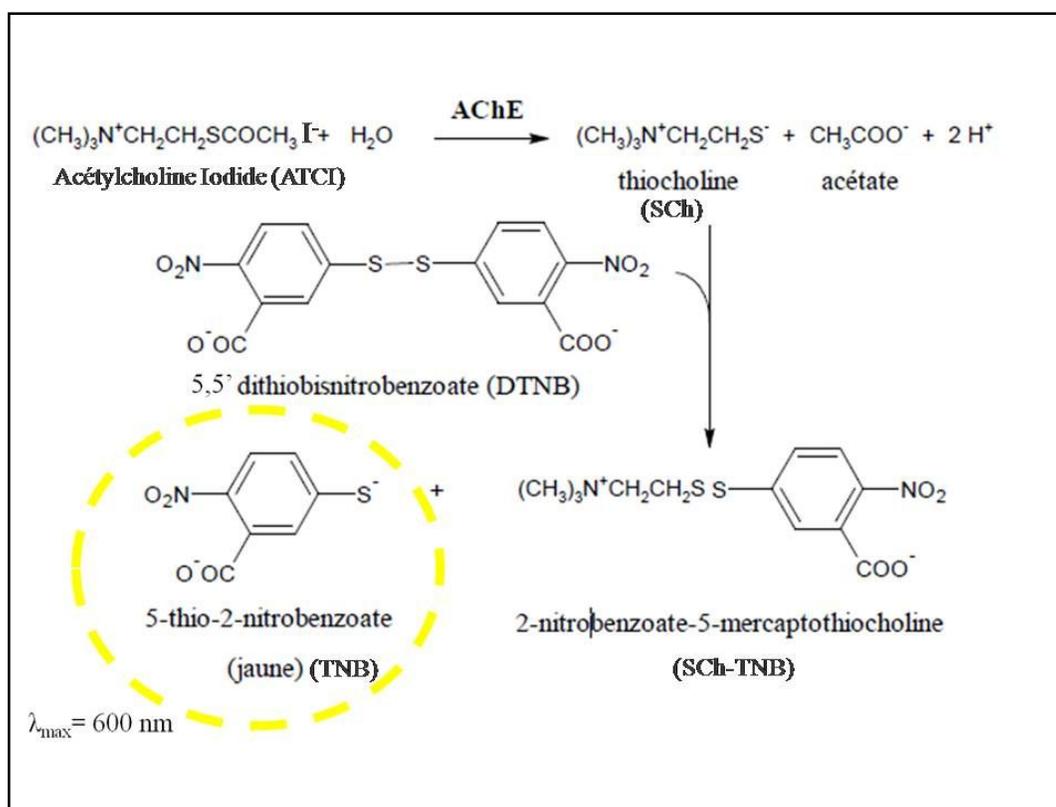


Figure 26. Réaction colorimétrique d'Ellman.

Initialement utilisée dans des cuves, cette réaction a été adaptée depuis pour un usage en microplaques à 96 puits, permettant l'analyse simultanée d'un grand nombre d'échantillons

tout en réduisant la quantité de réactifs. C'est cette dernière technique que nous avons adopté dans le présent travail pour réaliser les tests *in vitro* consacrés à cette partie. Les puits ont été remplis par 227.3 μL de réactif d'Ellman (solution du DTNB préparée à 0.15 mM dans du tampon phosphate 0.1 M à pH = 7.4) auxquels ont été rajoutés 20 μL d'une solution d'AChE préparée à une concentration finale de 0.037 U/mL dans le tampon phosphate et 2.7 μL de solution contenant le produit à analyser. La réaction enzymatique a été initiée par addition de 20 μL de substrat (solution d'ATCI à 0.21 mM dans l'eau bidistillée). Après homogénéisation des puits par agitation pendant 3 à 5 secondes suivie d'une incubation à 25 °C pendant 5 min, l'absorbance est mesurée à 412 nm par un lecteur de microplaques (SpectraMax PC340, Molecular Devices, États-Unis). Le contrôle négatif a été réalisé dans les mêmes conditions en remplaçant le produit à analyser par du DMSO. Pour le contrôle positif, nous avons fait appel à la galantamine hydrobromide car considérée actuellement comme l'un des meilleurs inhibiteurs de l'AChE utilisé dans le traitement de la MA (Atanasova, M. et *al* 2015).

Il faut souligner que pour la détermination de l'IC₅₀ d'un composé, il est indispensable d'évaluer d'abord son pourcentage d'inhibition à partir de l'équation suivante :

$$I\% = 100 \times \frac{AC - AP}{AC}$$

AC : Absorbance du contrôle
AP : Absorbance du produit

Équation 3. Mode de calcul du pourcentage d'inhibition.

Dans un premier temps, le pourcentage d'inhibition a été calculé à une concentration maximale de 100 μM . Selon les travaux de Delogu G.L. et *al* (2016), tout composé dont le pourcentage d'inhibition ne peut atteindre le seuil de 50% à la concentration maximale de 100 μM est considéré comme inactif. Une telle démarche a pour but de limiter l'étude de l'IC₅₀ uniquement aux composés potentiellement actifs. Dans un deuxième temps, le pourcentage d'inhibition des composés actifs a été calculé aux différentes concentrations suivantes : 100 μM , 50 μM , 10 μM , 5 μM , 1 μM , 0,5 μM , 0,1 μM , 0,05 μM et 0,01 μM . Pour chaque concentration, l'expérience a été réalisée en triplicata (n = 3) (Khunnawutmanotham, N. et *al* 2016). En faisant appel au programme GraphPad prisme version 7.0 (<https://www.graphpad.com>), nous avons tracé pour chaque produit actif la courbe qui exprime l'évolution du pourcentage d'inhibition à différentes concentrations du produit. La

valeur de l'IC₅₀ de chaque composé est alors directement relevée à partir de sa courbe dose-réponse.

3. Recherche des analogues structuraux

En utilisant le script « *FPGen* » du programme Schrödinger, nous avons défini l'empreinte 2D (Types d'atomes, de liaisons, de cycles, de groupements fonctionnels...etc.) des molécules potentiellement très actives ou hits dont les IC₅₀ expérimentaux révèlent des valeurs nettement plus faibles que la molécule de référence la galantamine (Duan J. et *al* 2010). À partir de ces données et en appliquant le coefficient de Tanimoto (Tanimoto, T.T. 1958), dont la valeur varie de 0 à +1 (+1 indique le pourcentage de similarité le plus élevé), la chimiothèque de Curie a pu nous faire ressortir tous les analogues structuraux qui s'apparentent aux mêmes familles chimiques que les hits originels avec un seuil minimum de similarité de 70% (Atanasova, M. et *al* 2015). Une fois leur IC₅₀ déterminé, selon le même protocole expérimental décrit plus haut, l'analyse fut poursuivie par une étude de la relation structure-activité (RSA) par une comparaison visuelle de leur mode d'interaction avec l'enzyme par rapport aux hits de départ.

4. Prédiction des propriétés ADMET

Les propriétés d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'élimination et de toxicité (ADMET) déterminées comme défavorables par les méthodes classiques expérimentales ont été identifiées comme étant la cause majeure d'échec dans le processus de développement des molécules à visée thérapeutique (Van de Waterbeemd, H. et *al* 2003). Dès lors, la nouvelle démarche qui consiste à prédire précocement ces propriétés par les méthodes de sélection ou filtrage *in silico*, à partir de la structure 2D de la molécule, est devenue une étape incontournable qu'il est nécessaire d'utiliser au préalable avant d'entamer l'étape expérimentale (Ferreira, L.L.G. et *al* 2019).

La connaissance des propriétés ADMET des molécules notamment en ce qui concerne leur perméabilité membranaire, stabilité métabolique et toxicité passe par une connaissance préalable de leurs propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques que l'on tentera de déterminer en faisant appel à des méthodes prédictives *in silico*.

4.1. Propriétés physicochimiques

4.1.1. Règle de Lipinski

Les propriétés physico-chimiques des composés, dont l'activité anticholinestérasique a été prouvée expérimentalement *in vitro*, ont été déterminées par la règle de 5 énoncée par Lipinski et *al* (1997) via le serveur SwissADME (<http://www.swissadme>) (Daina, A. et *al* 2017). La règle a pour but de nous renseigner sur la forme galénique et le mode d'administration notamment par voie orale que doit prendre le futur médicament. Elle a été définie à partir de l'analyse de 2248 candidats médicaments ayant passé avec succès les tests cliniques. Selon cette règle, tout composé ne validant pas au moins deux des quatre critères suivants est susceptible de poser des problèmes d'administration par voie orale :

- Le poids moléculaire (PM) doit être inférieur ou égal à 500 Da.
- Le logarithme décimal du coefficient de partage eau / n-octanol, noté logP, doit être compris entre -2 et 5.
- Le nombre de donneurs de liaisons hydrogène (nOHNO) doit être inférieur ou égal à 5.
- Le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène (nON) doit être inférieur ou égal à 10.

4.1.2. Règle de Veber

Pour une sélection plus rigoureuse des composés « *drug-like* », Veber, D.F. et *al* (2002) proposent un complément de la règle de Lipinski par les deux critères suivants établis à partir des données pharmacocinétiques de 1100 candidats-médicaments testés sur des rats :

- L'aire de surface polaire (TPSA) doit être inférieure ou égal à 140 \AA^2 .
- Le nombre de liaisons flexibles (nLF) doit être inférieur ou égal à 15.

4.1.3. Solubilité dans l'eau

La solubilité dans l'eau est un autre paramètre des plus importants dont doit disposer un candidat-médicament pour atteindre sa cible avec la concentration souhaitée (Savjani, K.T. et *al* 2012). Elle représente l'un des meilleurs moyens de prédiction de la biodisponibilité et l'absorption des médicaments administrés par voie orale ou à l'usage parentéral (Ottaviani, G. et *al* 2010).

4.1.4. Accessibilité à la synthèse

Dans la plupart des cas, les hits subissent des modifications structurales afin d'améliorer leur activité et leur pénétration dans les cellules mais aussi de diminuer leur toxicité. Ces modifications structurales ne peuvent malheureusement pas avoir lieu si la synthèse chimique des hits s'avère difficile à réaliser. L'accessibilité à la synthèse est donc l'un des facteurs décisifs de la réussite de l'étape d'optimisation de la structure moléculaire des hits. L'accessibilité à la synthèse chimique est ici simulée par une échelle de valeurs allant de 1 à 10 (Daina, A. et *al* 2017). La valeur +1 est attribuée à un composé très facile à synthétiser et va crescendo avec la difficulté de sa synthèse.

4.2. Propriétés pharmacocinétiques

Un composé expérimentalement actif peut, pour atteindre sa cible dans le corps, rencontrer sur son chemin divers obstacles à différents niveaux : buccal, gastrique, intestinal, pulmonaire, hépatique, rénal, encéphalique et dermique (Petito, E.S et *al* 2018). Le composé doit franchir ces barrières avec une concentration suffisante et y rester sous sa forme active suffisamment longtemps pour que les événements biologiques attendus se produisent (Akik, W. 2017). Sa capacité à franchir ces barrières est liée à ses différentes caractéristiques pharmacocinétiques que l'on tentera de déterminer dans ce travail via le même serveur SwissADME (<http://www.swissadme>).

4.2.1 Inhibition des Cytochromes P450

Les cytochromes P450 (CYP) sont des enzymes ubiquitaires intervenant dans le métabolisme de substrats endogènes ou exogènes, notamment médicamenteux. Les principaux CYP impliqués dans le métabolisme de la plupart des médicaments sont : CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 et CYP3A4. L'inhibition de ces isoenzymes pourrait entraîner des effets toxiques ou indésirables pour l'organisme (Raunio, H. et *al* 2015). En présence, d'un inhibiteur enzymatique, les médicaments fortement métabolisés par le système enzymatique inhibé ont un métabolisme diminué et leur demi-vie d'élimination plasmatique augmente. D'où l'intérêt de prédire si nos composés agissent ou pas en tant qu'inhibiteurs de ces isoenzymes.

4.2.2. Absorption gastro-intestinale

L'absorption gastro-intestinale est un autre paramètre important qu'il faut prédire car un bon candidat-médicament doit être capable de surmonter l'environnement gastrique acide et la sécrétion continue de mucus qui protège le tractus gastro-intestinal pour atteindre sa cible (Daina, A. et al 2016 ; Ensign, L.M. et al 2012).

4.2.3. Perméabilité des lignées Caco-2

La perméabilité intestinale d'un candidat-médicament est une étape qu'il est nécessaire de déterminer dès les premières phases du développement pharmaceutique. Dans ce contexte, les techniques de culture cellulaire permettent de reconstituer facilement des monocouches de cellules qui reproduisent dans les épithéliums du tube digestif. Ces monocouches sont couramment utilisées pour évaluer le transport des molécules actives. Les lignées cellulaires de type *Carcinome colorectal humain-2* (Caco-2) sont les plus fréquemment utilisées lorsqu'on veut évaluer le comportement d'une substance active envers l'épithélium digestif (Godefroy, B.M. 2017). Dans le présent travail, nous avons également pu simuler la capacité des hits identifiés à traverser les monocouches des cellules Caco-2.

4.2.4. Perméabilité hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique ou *Blood-Brain Barrier* est une barrière physique et métabolique isolant et protégeant le cerveau du reste de l'organisme. Elle intervient quotidiennement dans la régulation de l'homéostasie cérébrale. À cause de cette barrière, de nombreux médicaments potentiels pour le traitement des maladies du système nerveux central, telle que la MA, ne peuvent pas atteindre leur lieu d'action avec des concentrations suffisantes (Daina, A. et al 2016 ; Wohlfart, S. et al 2012). Il s'avère par conséquent indispensable de prédire la capacité de nos inhibiteurs de l'AChE à franchir cette barrière.

4.3. Toxicité potentielle

La toxicité d'une molécule biologiquement active (hit) est l'un des paramètres les plus redoutés lors de son optimisation en candidat-médicament (*lead*). À ce titre, de nombreuses méthodes *in silico* ont été élaborées pour la prédiction précoce de la toxicité potentielle des hits. Ces méthodes ont pour avantages d'être plus économiques et écologiques en termes surtout de réduction des modèles animaux et des essais cliniques risqués.

La toxicité potentielle des hits identifiés dans cette étude a été déterminée en faisant appel au serveur PreADMET (<https://preadmet.bmdrc.kr/toxicity>). Ce dernier utilise des modèles QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*) permettant de simuler à partir de la structure 3D du hit, sa toxicité potentielle par différents tests.

4.3.1. Le test d'Ames

Il s'agit du test de mutagenicité le plus répandu. Il consiste à examiner si une substance chimique ou un agent physique est capable d'induire des mutations spécifiques chez différentes souches de *Salmonella typhimurium*. Ces dernières sont porteuses d'une mutation dans un des gènes gouvernant la synthèse de l'acide aminé histidine. Cette mutation **His⁻** rend les souches incapables de pousser sur un milieu sans histidine.

Les souches sont cultivées dans des milieux dépourvus d'histidine mais en présence du composé à tester. Si ce dernier s'avère non mutagène, le développement des bactéries n'aura pas lieu. Dans le cas contraire, la substance induit une mutation réverse vers **His⁺** permettant aux cellules de retrouver leur capacité à pousser sur un milieu sans histidine (Rainer, B et al 2018).

4.3.2. Le test d'inhibition du gène hERG

Le gène hERG (*human Ether-à-go-go-Related Gene*) code pour un canal potassique voltage dépendant qui fait sortir le potassium de la cellule. Le dysfonctionnement ou le blocage de ce canal provoque des fibrillations pouvant aller jusqu'à l'arrêt cardiaque (Jing, Y. et al 2015), d'où l'importance de connaître pour nos composés leur capacité d'inhiber ce canal.

4.3.3. Le test de cancérogénicité

Grâce aux modèles QSAR qu'utilise le serveur PreADMET, il est également possible de prédire les éventuels effets cancérogènes de nos composés envers les rats et les souris. Il est largement admis que les agents cancérogènes pour ces deux espèces le sont également pour l'homme (Von Tungeln, L.S et al 2016).

4.3.4. Le test de toxicité potentielle aigüe

Le test de toxicité aigüe permet d'évaluer le degré de nuisance potentielle d'une molécule pour un organisme vivant. Cette toxicité a été simulée par le serveur PreADMET sur

différents organismes aquatiques en l'occurrence les algues (*algae*), les crustacés (*daphnia*) et les poissons (*medaka* et *minnow*) (Anton, C. et al 2017).

5. Evaluation *in vivo* de la toxicité aigüe des hits

Les composés ayant révélé une activité anti-AChE expérimentalement plus élevée que celle de la galantamine ont fait l'objet d'une évaluation *in vivo* de leur cytotoxicité sur des larves d'*Artemia salina*. Ce test, facile à mettre en œuvre, est largement utilisé dans l'évaluation préliminaire de la toxicité aigüe des composés à intérêt pharmacologique (Atiar, M.R. et al 2013). Le choix des larves est particulièrement dicté par leur disponibilité et leur préparation facile et rapide mais surtout par la nécessité de très faibles quantités des produits à analyser.

5.1. Préparation des *Artémia*

Une quantité de 2g d'œufs d'*Artemia salina* a été déposée dans 2000 ml d'eau de mer ajustée par une solution de NaOH à pH 8,3. Le mélange a été incubé à 30°C pendant 48h sous une lumière artificielle continue favorisant un meilleur rendement. L'alimentation en oxygène a été assurée par une pompe reliée au récipient contenant le mélange. Afin de prévenir le risque de mortalité par la faim, les larves ont été nourries, après 24 heures d'exposition à la lumière, par la levure alimentaire.

5.2. Préparation des composés

Pour chaque composé, nous avons préparé la même série de concentrations utilisées pour les tests *in vitro* de l'activité anti-AChE. À titre de rappel, les solutions ont été préparées en présence de DMSO aux concentrations suivantes : 100 μM , 50 μM , 10 μM , 5 μM , 1 μM , 0,5 μM , 0,1 μM , 0,05 μM et 0,01 μM .

5.3. Protocole du test de cytotoxicité

Les tests ont été réalisés dans des tubes à hémolyse contenant chacun 4.9 ml d'eau de mer en présence de 10 larves auxquels ont été rajoutés 100 μL de la solution du produit à analyser. Les tubes ont été ensuite incubés pendant 24 H à 30°C. Un tube de contrôle négatif a été préparé dans les mêmes conditions en remplaçant le produit à analyser par du DMSO. Pour le contrôle positif, nous avons utilisé la galantamine qui est, rappelons-le, l'un des

inhibiteurs de l'AChe les plus utilisés dans le traitement de la MA. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata (n = 3).

5.4. Evaluation du pourcentage de mortalité des larves

Pour chaque concentration, le pourcentage de mortalité a été calculé, par comptage des larves vivantes, selon la relation suivante :

$$\% \text{ de mortalité} = ((A-B)*100)/B$$

A : nombre de larves vivantes dans le tube contrôle

B : nombre de larves vivantes dans le tube contenant le produit à tester

Équation 4. Calcul du pourcentage de mortalité des larves (Meyer *et al*, 1982)

Basée sur le pourcentage de mortalité, la concentration létale 50 de chaque produit ou concentration nécessaire pour tuer 50% des larves (CL₅₀) a été déterminée à partir de sa courbe dose-réponse (Atiar M.R et al, 2013), tracée à l'aide du programme GraphPad prisme version 7.0 (<https://www.graphpad.com>).

Résultats
et
Discussion

1. Validation du protocole de criblage virtuel

Dans le but d'identifier de nouveaux inhibiteurs de l'AChE, deux études complémentaires furent menées dans ce travail. La première qui nous intéresse dans cette partie du travail est une étude théorique dite *in silico* qui consiste à réaliser d'abord un criblage virtuel des 14307 composés que comprend la chimiothèque de Curie par quatre programmes de docking moléculaire parmi les plus performants dans ce domaine : Gold, Glide, Surflex et FlexX.

1.1. Evaluation de la performance des programmes de criblage virtuel

La performance des programmes Gold, Glide, Surflex et FlexX a été vérifiée par criblage d'une chimiothèque totale composée de 14307 molécules de la chimiothèque de Curie enrichie par l'ajout de 451 composés de la DUD-E connus pour leur activité inhibitrice à l'égard de l'AChE. Selon les travaux de Empereur-Mot, C. (2017), un programme de docking moléculaire est qualifié de performant s'il est capable de classer en premier les molécules actives connues de la DUD-E par rapport aux autres molécules de la chimiothèque. En se basant arbitrairement sur les 500 premières molécules issues du criblage de la chimiothèque totale, les résultats montrent que les trois programmes Surflex, Glide et Gold sont plus performants que le programme FlexX. En effet, Surflex vient en première position en faisant ressortir 221 molécules actives de la DUD-E correspondant à un taux de sortie de 44%, suivi par Glide avec 176 molécules actives correspondant à un taux de 35%, vient ensuite GOLD avec 127 molécules correspondant à un taux de 25% et enfin arrive en dernière position FlexX qui ne fait ressortir que seulement 30 molécules actives correspondant à un taux de sortie de 6% (Tableau 3).

Tableau 3. Evaluation de la performance des programmes de docking moléculaire Gold, Glide, Surflex et FlexX en fonction du taux de sortie des inhibiteurs connus de la DUD-E dans les premières portions du classement.

Programme	Nombre de composés actifs	Pourcentage
Surflex	221	44%
Glide	176	35%
GOLD	127	25%
FlexX	30	6%

En traçant les courbes d'enrichissement des quatre programmes, nous avons pu suivre, pour chacun d'eux, l'évolution du taux de sortie des 451 molécules actives de la DUD-E par rapport aux autres molécules de la chimiothèque (figure 27).

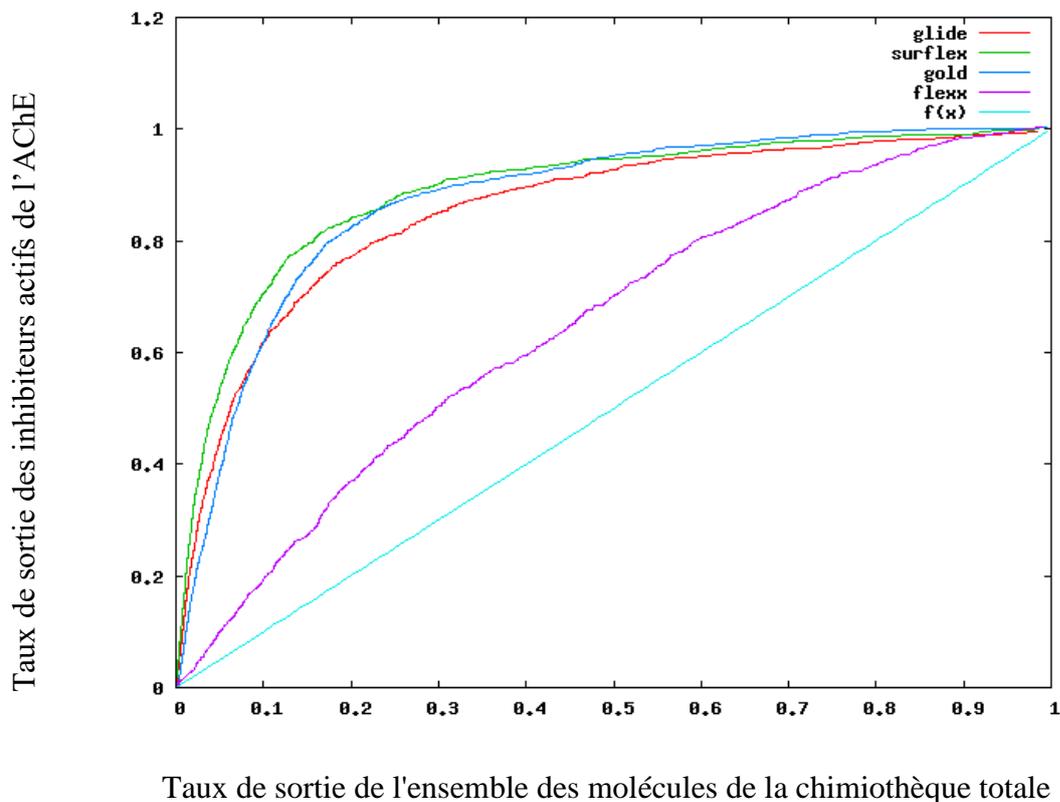


Figure 27. Courbes d'enrichissements des programmes Surflex (vert), Glide (rouge), Gold (bleu) et FlexX (violet) évoquant le classement des molécules actives. La droite (bleu ciel) correspond au classement aléatoire ou *Random*.

En comparant l'allure hyperbolique des différentes courbes d'enrichissement avec la droite *random* correspondant au taux de sortie aléatoire des molécules actives de la DUD-E par rapport à la chimiothèque totale, on relève en effet, la haute performance des programmes Surflex, Glide et Gold qui arrivent, conformément aux travaux de Empereur-Mot, C. (2017), à discerner facilement les molécules actives, en leur attribuant les meilleurs scores qui les classifient dans les premières portions du classement global des composés criblés. Ceci témoigne de la capacité de ces programmes à identifier, sans trop de risque d'erreurs, de nouvelles molécules à forte activité inhibitrice à l'égard de l'AChe. Il en va autrement avec FlexX qui n'a pas été retenu dans cette étude en raison de l'aire très réduite apparaissant entre la courbe d'enrichissement de FlexX et le *random* témoignant de sa faible capacité à prédire un bon classement des molécules actives de la DUD-E.

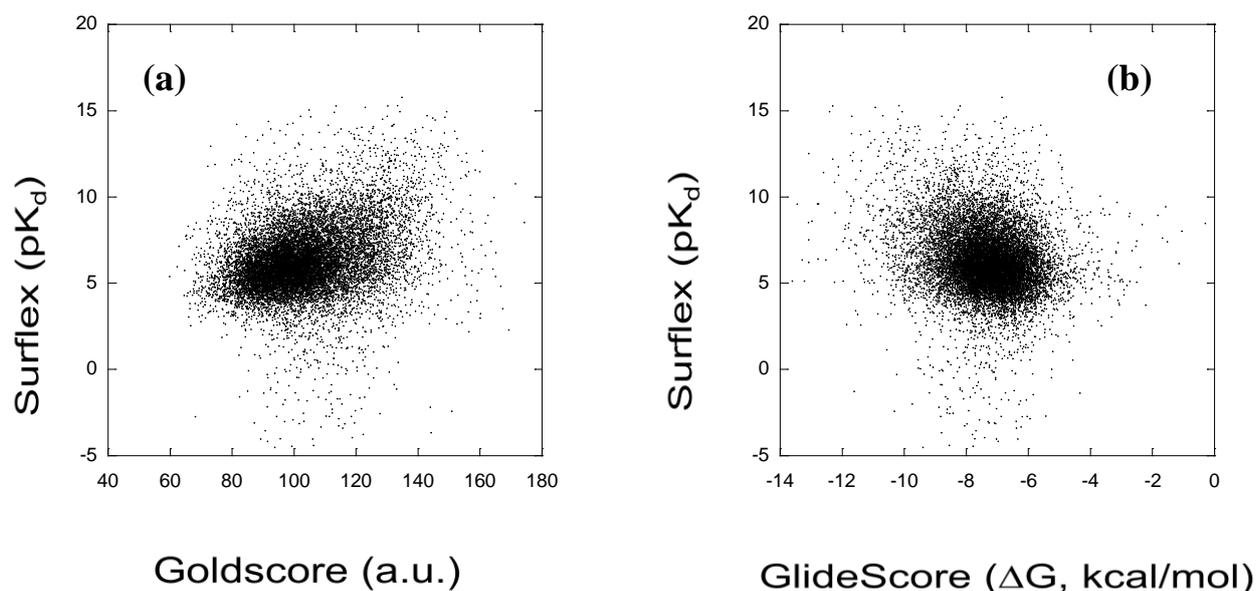
1.2. Apport de la méthode dite *variable Standard Deviation Consensus*

En considérant séparément les trois programmes Surflex, Gold et Glide, nous constatons que pour un même composé, ces derniers génèrent un classement divergent en raison notamment de leur fonction de score et algorithme de positionnement différents. Le tableau 4 suivant présente, à titre d'exemple, le classement divergent de quelques-uns de nos composés résultant du criblage virtuel de la chimiothèque de Curie.

Tableau 4. Classement par Glide, Gold et Surflex de quelques inhibiteurs de l'AChE

Inhibiteurs actifs	Glide	Gold	Surflex
CHEMBL410915	9	95	4
CHEMBL406885	26	25	10
CHEMBL406645	5	98	13
Galantamine	1565	1464	168

Afin de mieux illustrer cette divergence de classement des scores générés par ces trois programmes, nous avons jugé utile de comparer deux à deux les résultats par une représentation graphique. Cette dernière révèle une très forte dispersion des nuages de points témoignant à l'évidence de l'absence de corrélation entre ces trois programmes (figure 28).



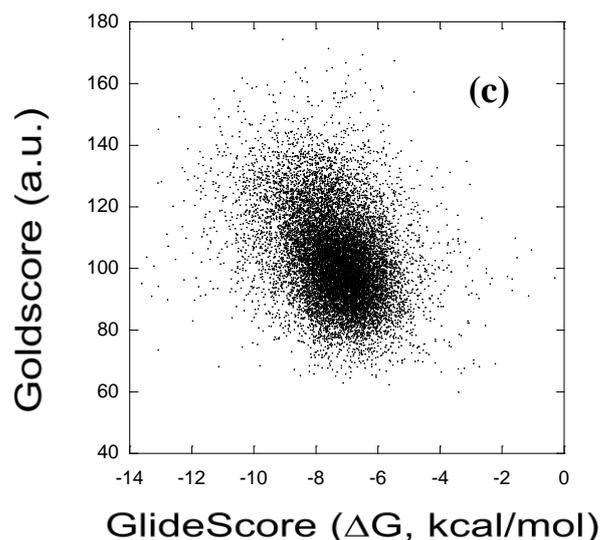


Figure 28. Représentation graphique montrant le degré de corrélation des scores générés par Surflex et Gold (a), Surflex et Glide (b), et Gold et Glide (c).

Afin d'établir un consensus entre ces différents résultats et de réduire leur divergence, ces derniers ont été regroupés dans un même fichier et traités par la méthode vSDC. En combinant les résultats des trois programmes Surflex, Gold et Glide, cette approche a pu générer un nouveau classement avec un nombre plus élevé de molécules actives de la DUD-E dans les premières portions du classement. En effet, sur les 500 premières molécules générées par le criblage virtuel de la chimiothèque enrichie, le programme vSDC fait ressortir 12 molécules actives de la DUD-E de plus que le programme Surflex qui a, à titre de rappel, affiché le meilleur classement (tableau 3). Ainsi, grâce à cette méthode, le nombre total s'est élevé à 233 molécules actives correspondant à un taux de 47% légèrement supérieur à celui de Surflex dont le taux n'atteint que 44%. Cette amélioration des résultats témoigne de la haute performance de la méthode vSDC qui s'exprime par une courbe d'enrichissement à l'allure hyperbolique nettement située au-dessus de celles obtenues avec les trois programmes Gold, Glide et Surflex (figure 29).

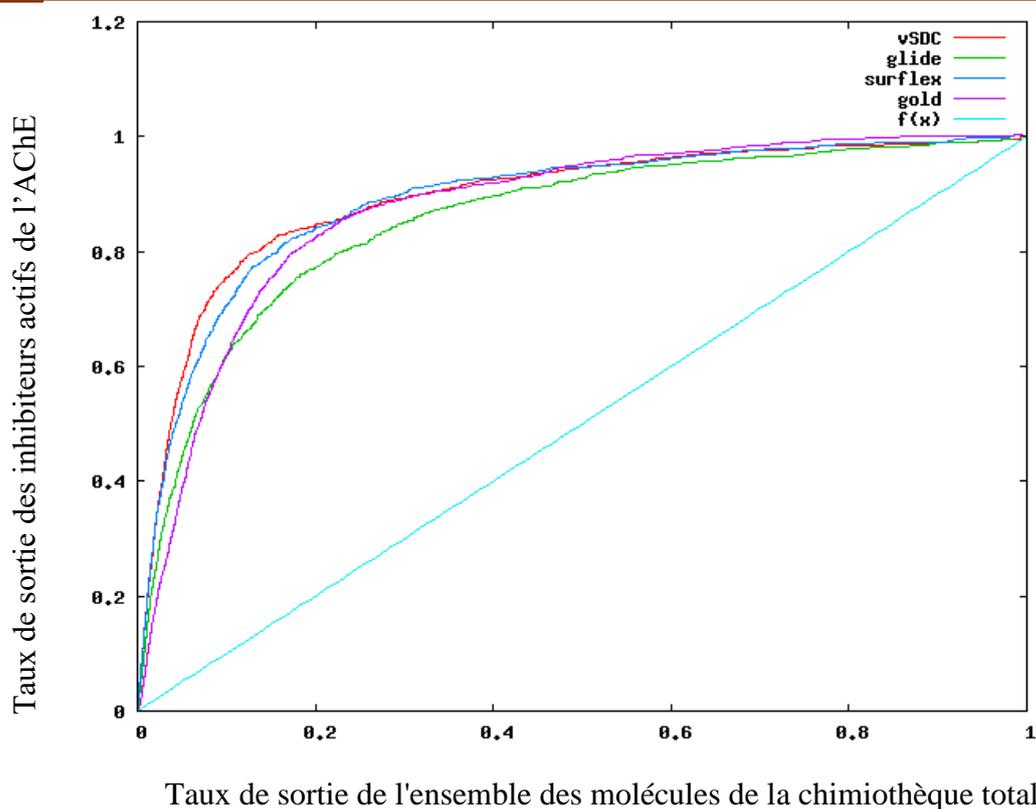


Figure 29. Comparaison des courbes d'enrichissement des programmes vSDC (rouge), Surfex (bleu), Gold (violet), Glide (vert) et le *Random* (droite bleu ciel).

À la lumière de ces résultats prometteurs, le classement généré par la méthode vSDC a été évidemment retenu dans cette étude en vue d'identifier de nouveaux inhibiteurs de l'AChE potentiellement plus actifs que la galantamine.

1.3. Sélection par analyse visuelle des molécules potentiellement actives

L'analyse visuelle du mode de positionnement dans la cavité catalytique est une étape déterminante dans la sélection de nouveaux inhibiteurs de l'AChE provenant du criblage virtuel de la chimiothèque de Curie. Conformément aux travaux Di Giovanni, C. et *al* (2016) et Koyama, T. et *al* (2017), seul, un taux de 1% de la chimiothèque de Curie correspondant aux 150 premières molécules du classement généré par vSDC a été pris en considération en vue d'un examen visuel minutieux permettant de faire ressortir les meilleurs inhibiteurs de l'AChE. Les molécules ont été d'abord regroupées suivant leur appartenance chimique et seul le composé de chaque famille ayant adopté un mode de liaison le plus favorable avec le site actif et notamment avec la triade catalytique Ser203, His447 et Glu334 de l'enzyme a été retenu. Au total, une vingtaine de molécules a été sélectionnée mais en raison de la disponibilité physique et quantitative au niveau de la chimiothèque de Curie,

seulement dix d'entre elles, de structures différentes, ont pu faire l'objet d'une évaluation expérimentale de leur pouvoir inhibiteur envers l'AChE. Ces composés portant les identifiants de la chimiothèque de Curie sont représentés dans la figure 30 suivante.

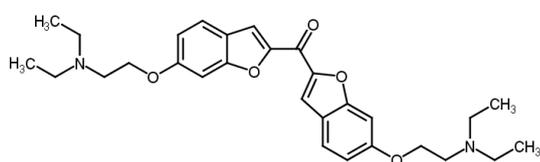
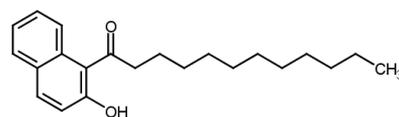
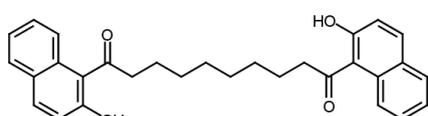
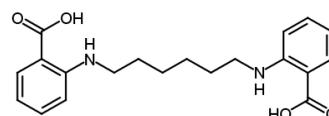
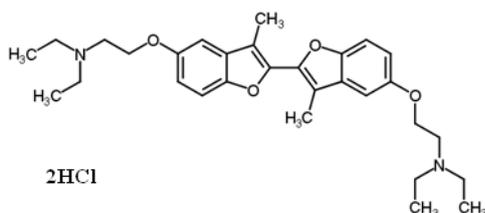
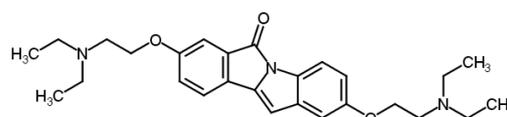
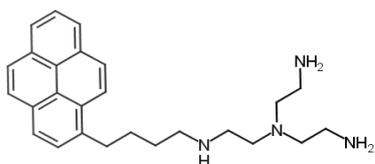
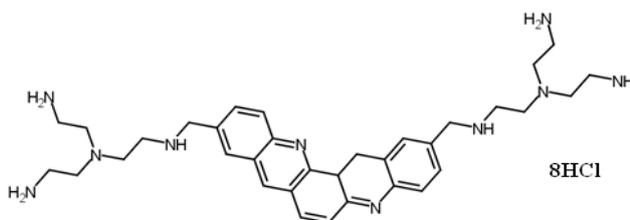
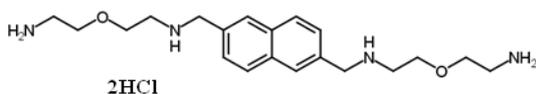
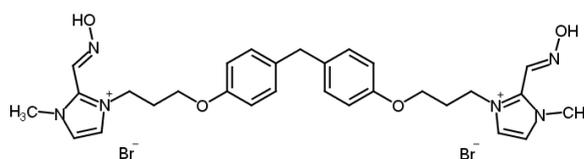

3039

3543

3553

10679

10758

11288

14359

14369

14751

16063

Figure 30. Structure moléculaire des composés avec leur identifiant sélectionnés par l'analyse visuelle.

2. Evaluation expérimentale de l'activité anti-AChE des molécules potentiellement actives

L'évaluation expérimentale *in vitro* de l'activité anti-AChE des dix composés sélectionnés précédemment par l'analyse visuelle a été réalisée en deux étapes respectives dont la première consiste à calculer leur pourcentage d'inhibition et la deuxième à déterminer leur IC₅₀ ou concentration nécessaire pour réduire l'activité enzymatique de moitié.

2.1. Détermination du pourcentage d'inhibition

Le pourcentage d'inhibition a été d'abord calculé à une concentration maximale de 100 µM pour tous les composés y compris la galantamine, utilisée ici comme standard (tableau 5). Selon Delogu G.L. et *al* (2016), tout composé dont le pourcentage d'inhibition à cette concentration n'atteint pas 50% est considéré comme inactif.

Tableau 5. Pourcentage d'inhibition de l'AChE à la concentration de 100 µM des dix composés étudiés.

Composé	Pourcentage d'inhibition (± SD) à 100 µM	Aspect
11288	98.40 ± 0.74	Incolore
10758	98.18 ± 0.33	Incolore
Galantamine	97.21 ± 1.43	Incolore
3039	96.22 ± 1.32	Incolore
16063	94.18 ± 2.03	Incolore
14369	94.45 ± 3.48	Incolore
3543	85.97 ± 3.14	Incolore
14751	62.94 ± 2.57	Incolore
3553	55.06 ± 3.7	Incolore
10679	4.98 ± 3.33	Jaune
14359	3.06 ± 0.9	Jaune

Il ressort du tableau que, hormis les deux composés **10679** et **14359**, le pourcentage d'inhibition des autres composés ainsi que la galantamine dépasse largement le seuil fixé à 50%. Ces composés potentiellement actifs à l'égard de l'AChE seront dorénavant désignés par le terme de « hits ».

2.2. Détermination de l'IC₅₀

La détermination préalable du pourcentage d'inhibition à la concentration de 100µM nous a essentiellement permis de limiter l'étude de l'IC₅₀ uniquement aux huit composés potentiellement actifs ou hits du tableau 5. À ce titre, pour chaque composé et aussi pour la galantamine, nous avons calculé le pourcentage d'inhibition à neuf concentrations différentes (tableau 6)

Tableau 6. Evaluation des pourcentages d'inhibition des hits à différentes concentrations

Concentration (µM)		Hits								
		100	50	10	5	1	0.5	0.1	0.05	0.01
pourcentage d'inhibition moyen (± SD)	11288	98.40± 0.74	98.77± 0.11	98.58± 0.24	98.36± 0.11	95.75± 0.55	92.36± 0.5	75±1.3 5	55.29± 3.54	29.88± 4.1
	10758	98.18± 0.33	98.66± 0.15	98.11± 0.19	96.62± 0.40	89.16± 0.72	70.51± 2.6	29.59± 1.32	12.38± 1.18	6.51±2 .48
	Galantamine	97.21± 1.43	97.21± 1.09	90.24 ±1.14	84.90± 0.96	55.31± 3.01	28.34± 2.2	26.51± 1.73	11.38± 2.05	4.28±1 .33
	3039	97.01± 0.56	96.63± 0.79	93.75± 1.47	86.74± 1.25	54.54± 2.12	24.88± 1.43	20.17± 3.54	10.65± 1.41	7.9±0. 98
	16063	96.1±0 .88	95.32± 0.98	90.11± 1.8	81.23± 0.49	49.44± 1.97	22.35± 1.05	11.2±2 .01	8.01±2 .55	6.89±1 .3
	14369	96.59± 0.87	96.42± 0.99	89.14± 1.39	64.32± 2.76	45.32± 2.91	36.04± 2.06	6.90±2 .32	3.89±1 .98	ND
	3543	87.62± 1.83	76.56± 1.33	59.10± 0.47	47.52± 1.87	39.42± 1.94	30.8±1 .69	14.04± 1.03	4.58±1 .99	ND
	14751	82.97± 0.88	70.11± 1.01	56.80± 1.18	33.59± 0.39	20.82± 2.72	10.47± 1.85	5.46±1 .65	ND	ND
	3553	82.62± 1.56	67.51± 1.83	18.72± 3.38	11.33± 1.12	5.87±2 0.7	ND	ND	ND	ND

ND : Non Déterminé

À partir des différentes valeurs du tableau, nous avons pu tracer la courbe dose-réponse montrant pour chaque produit la variation de son pourcentage d'inhibition aux concentrations indiquées (figure 31).

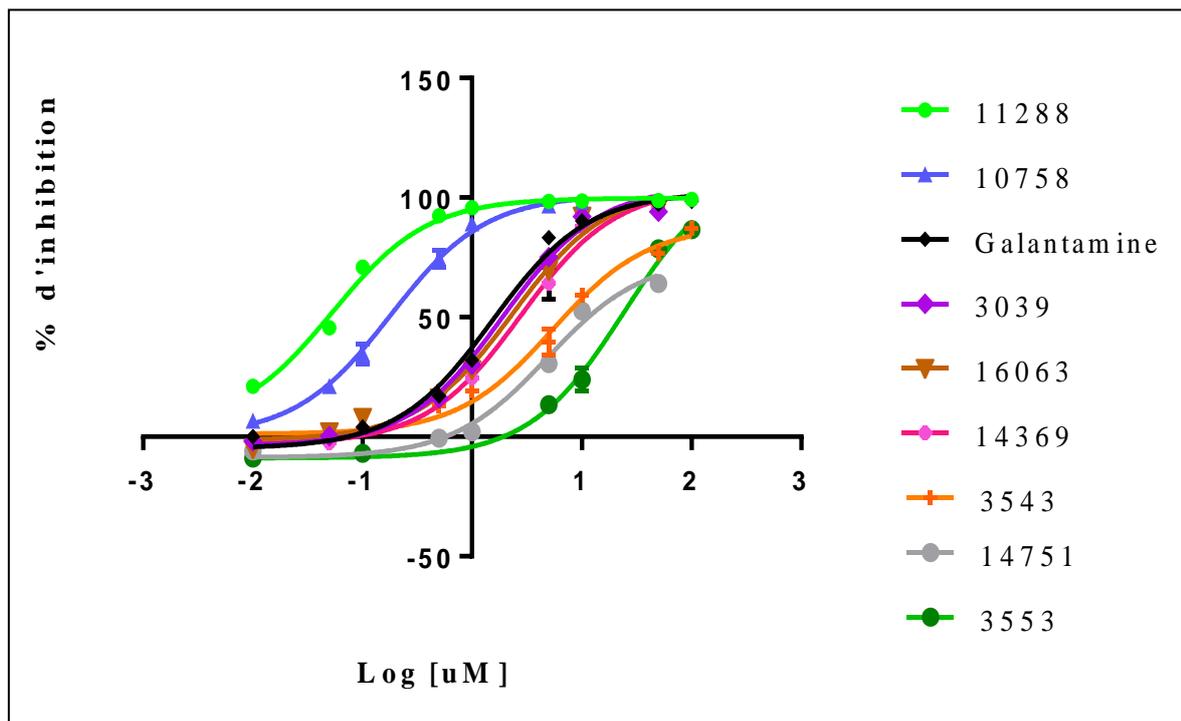


Figure 31. Courbes dose-réponse de la galantamine et des huit hits identifiés.

La valeur de l'IC₅₀ de chaque produit est directement déterminée à partir de sa courbe dose-réponse puis reportée dans le tableau 7 suivant.

Tableau 7. Valeurs des IC₅₀ de la galantamine et des hits identifiés.

Composé	IC ₅₀ ± SD (μM) (n = 3)	Aspect
11288	0.0473±0.0003	Incolore
10758	0.1998±0.0147	Incolore
Galantamine	0.7739±0.0239	Incolore
3039	0.8243±0.0598	Incolore
16063	1.0780±0.1470	Incolore
14369	1.3470±0.0325	Incolore
3543	5.2260±1.7040	Incolore
14751	6.8510±0.5930	Incolore
3553	20.5200±3.853	Incolore

Selon les travaux de Li, R.S. *et al.* (2013), un composé ne peut être considéré comme fortement actif que lorsque, par la méthode d'Ellman, son apparence vire du jaune vers l'incolore et révèle un IC_{50} inférieure à 20 μM . En référence à ces données bibliographiques, il ressort du tableau 7 que les huit hits étudiés ici, répondent favorablement à ces deux critères et peuvent de ce fait être considérés comme de puissants inhibiteurs de l'AChE.

L'autre observation qui se dégage également de ce tableau est la différence d'activité qui existe entre les huit composés que l'on peut classer par rapport à la galantamine en trois groupes différents. Le premier groupe dont les IC_{50} sont plus élevés que celui de la galantamine est constitué des composés **3543**, **14751** et **3553** qui, dans ce contexte, sont considérés comme des inhibiteurs les moins actifs à l'égard de l'AChE. Le deuxième groupe comprend les composés **3039**, **16063** et **14369** qui se caractérisent par des IC_{50} très proches de la galantamine produisant vraisemblablement un même effet inhibiteur. Enfin, le troisième groupe qui nous intéresse particulièrement dans cette étude est formé des deux hits **11288** et **10758** qui s'apparentent respectivement aux familles chimiques des isoindolo [2,1-a] indole (Guillaumel, J. *et al* 2003) et des bibenzofuranes (Guillaumel, J. *et al* 1986). Ces deux hits se distinguent des autres molécules par des IC_{50} très bas avec des valeurs strictement inférieures à 0.2 μM leur conférant un pouvoir inhibiteur à l'égard de l'AChE nettement plus fort que la galantamine.

3. Etude du mode d'interaction des hits **11288** et **10758**

Afin d'appréhender les mécanismes d'interaction qui régissent l'activité des deux hits **11288** et **10758**, nous avons jugé utile d'entreprendre une analyse visuelle comparative avec la pose cristallographique de la galantamine existante en complexe avec le site actif de l'AChE dans la PDB sous le code **4EY6**. Pour ce faire, nous avons fait appel aux deux programmes de visualisation Maestro 11.3 et PyMol 2.2.3. Comme le montre la figure 32, les deux hits **11288** et **10758**, de par la longueur de leur structure estimée respectivement à 17.26 Å et 17.81Å, sont profondément enfouis dans la cavité catalytique de l'enzyme et occupent la totalité de l'aire formée par les deux sites PAS et CAS responsables de l'activité de l'enzyme et ce, contrairement à la galantamine qui, conformément à la littérature, n'occupe que le CAS (Cheung, J. *et al* 2012).

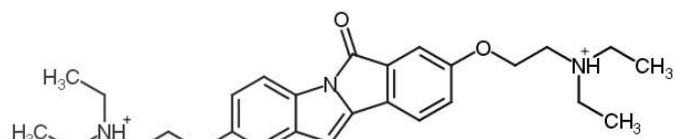
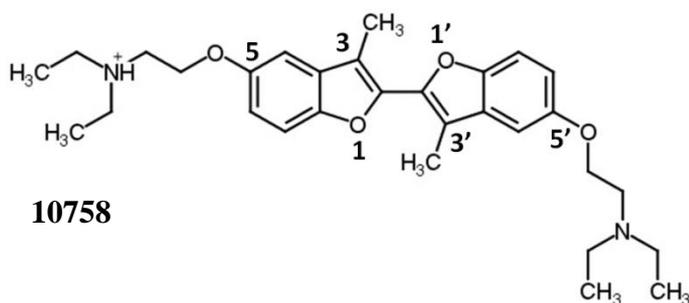
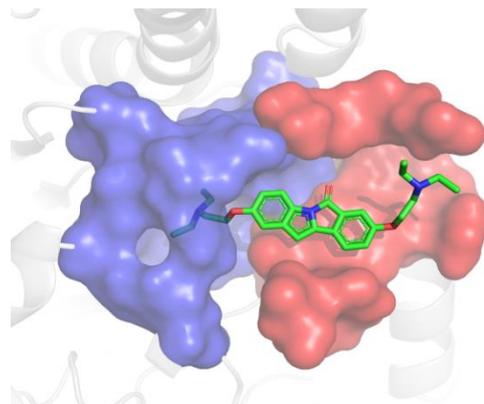
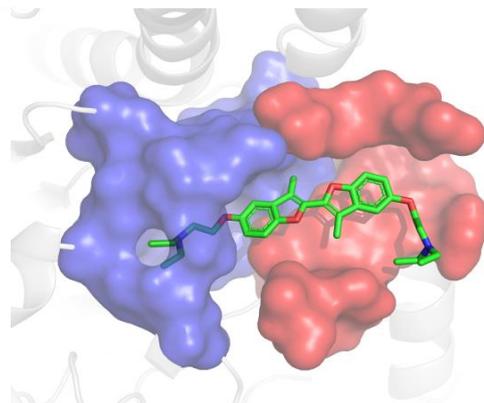
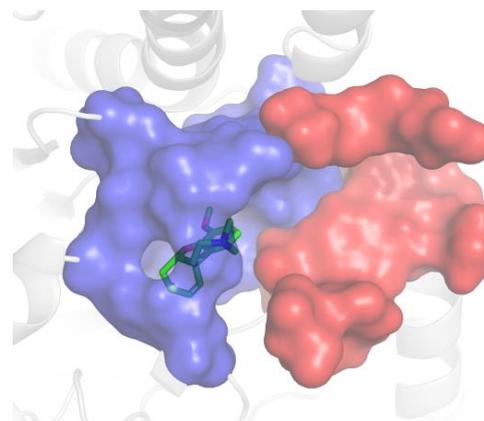
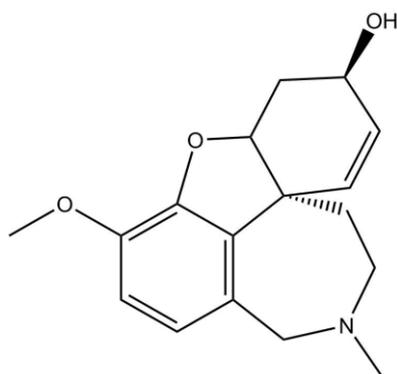
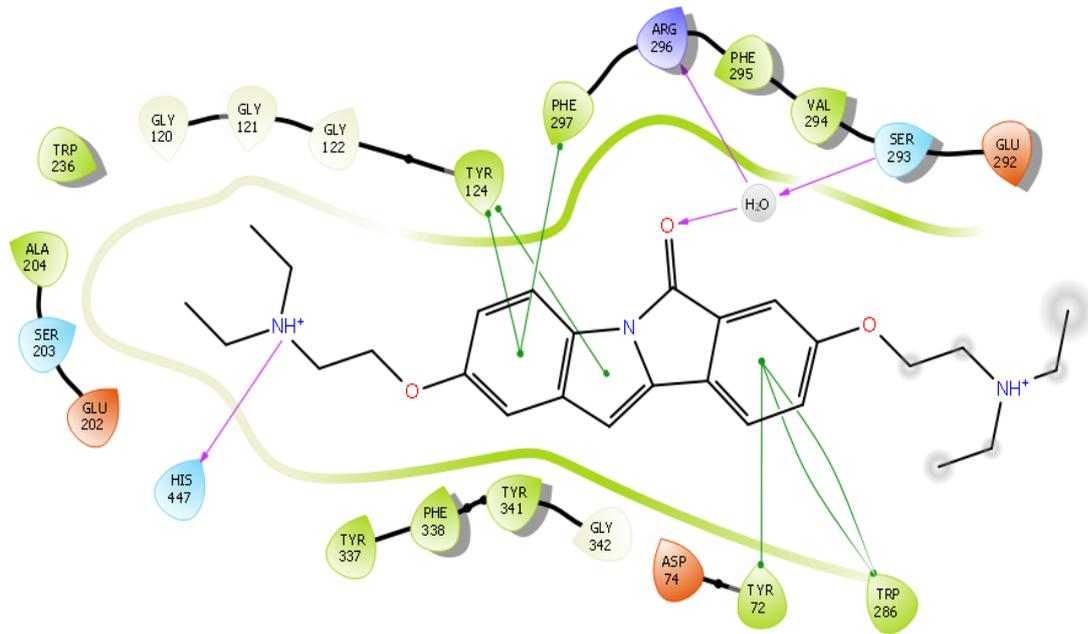

11288

10758

Galantamine


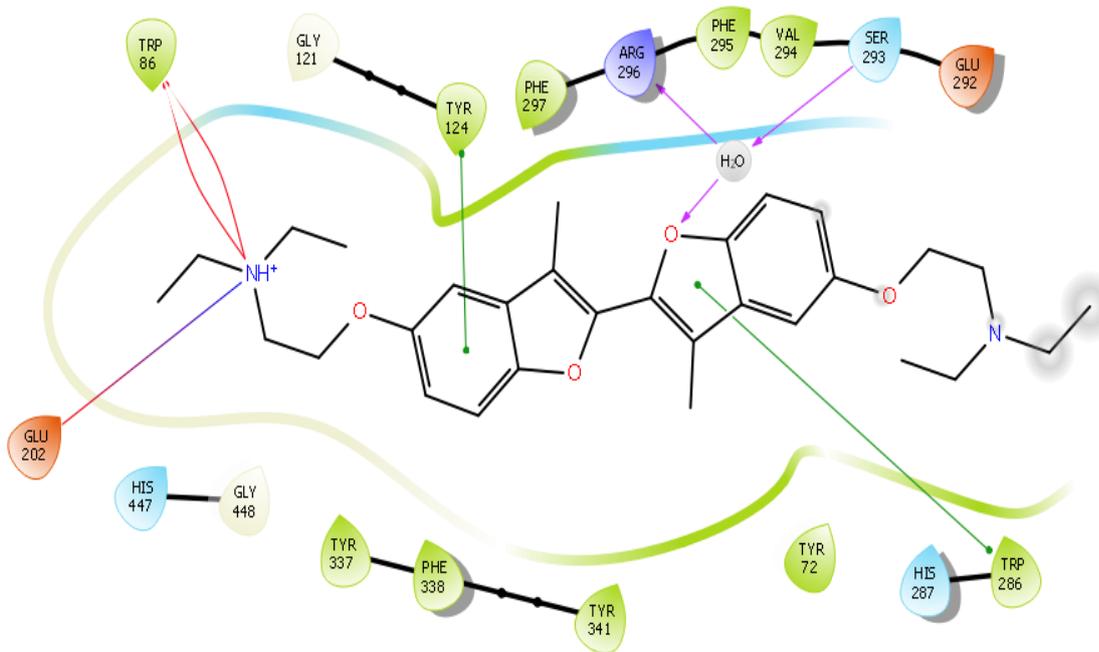
Figure 32. Mode de positionnement des hits **11288**, **10758** et de la galantamine dans la cavité catalytique de l'AChE. Le CAS est représenté en mode surface bleu et le PAS en mode surface rouge.

Ce mode de positionnement privilégié qu'adoptent les deux hits **11288** et **10758** par rapport à la galantamine, leur confère une plus forte activité à l'égard de l'AChE qui s'exprime par la mise en place de nombreuses et différentes interactions dans la cavité catalytique de l'enzyme (figure 33).

11288



10758



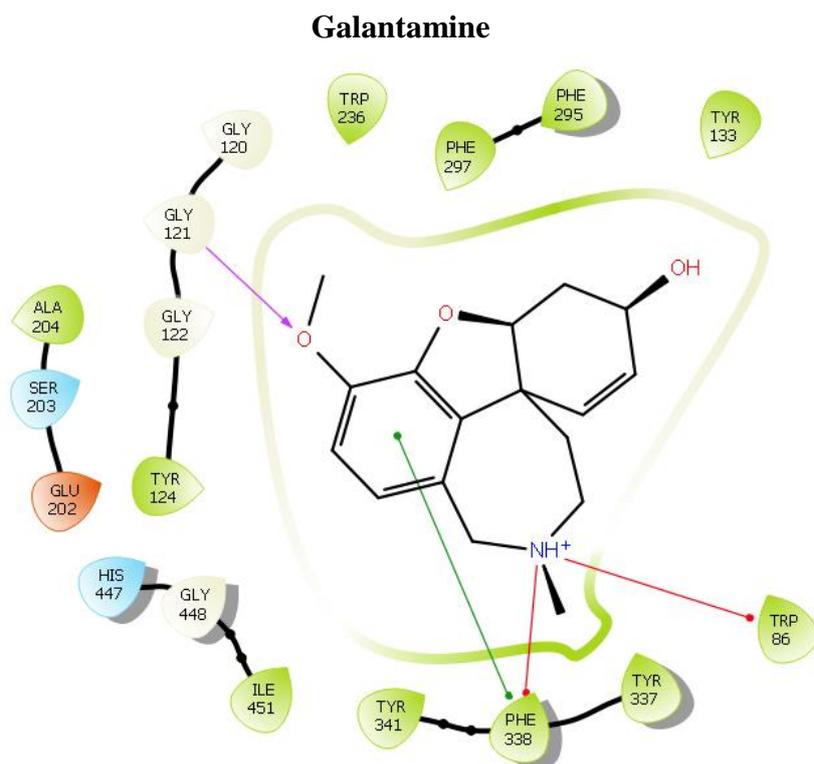


Figure 33. Mode d'interaction des hits **11288**, **10758** et la galantamine dans la cavité catalytique de l'AChE. Les liaisons hydrogène sont représentées en mauve, les interactions π -cation en rouge, les interactions π - π en vert et les interactions ioniques en mauve et rouge. Le cercle gris indique le contact avec l'eau.

En considérant séparément les deux sites de la cavité catalytique de l'enzyme, on constate, au niveau du PAS où la galantamine n'engage aucune liaison, que les deux hits **11288** et **10758** au contraire établissent respectivement quatre et deux interactions de type π - π avec les résidus Tyr124 et Trp286 lesquels jouent un rôle primordial dans la fixation du substrat naturel de l'AChE. Les travaux de Johnson, G. et *al* (2006) montrent que l'inhibition de ce site bloquerait l'entrée du substrat dans le site actif et diminuerait significativement l'activité de l'AChE. Par ailleurs, les deux hits **11288** et **10758** établissent dans ce même site chacun une liaison hydrogène avec une molécule d'eau, elle-même liée par deux liaisons hydrogène avec les résidus Ser293 et Arg296. Enfin, le hit **11288** se distingue par la mise en place d'une autre interaction de type π - π avec le résidu Tyr72 mettant en exergue sa différence d'activité avec le hit **10758**.

Au niveau du CAS, la galantamine établit en revanche quatre interactions dont deux de type π -cation avec les résidus Trp86 et Phe338 via son groupement aminium, une de type π - π avec le résidu Phe338 et une autre de type hydrogène avec le résidu Gly121. Il est utile de rappeler que le résidu Trp86 appartient à la poche anionique du site actif qui contribue à la

fixation de l'acétylcholine (Ordentlich, A. et al 2004 ; Kwasnieski, O. 2010) et que les deux résidus Phe338 et Gly121 sont respectivement responsables de la sélectivité et de la réactivité de l'AChE (Vagedes, P. et al 2000; Colletier, J.P. et al 2006).

Paradoxalement, les deux hits **11288** et **10758** ne forment dans ce site que très peu d'interactions. Le hit **10758** forme deux interactions via son groupement aminium dont l'une de type π -cation avec le résidu Trp86 et l'autre de type ionique avec le résidu Glu202. Quant au hit **11288**, il établit une interaction de type π - π avec le résidu Phe297 et une liaison hydrogène via son groupement aminium avec le résidu His447 qui est considéré comme l'un des plus importants résidus de la triade catalytique du CAS (Gerlits, O. et al 2019). Cette particularité du hit **11288** marque vraisemblablement une fois encore sa plus forte activité inhibitrice par rapport à la galantamine et au hit **10758**.

Ainsi, les modes de positionnement et les interactions qu'impliquent les deux hits **11288** et **10758** et la galantamine dans le PAS et le CAS de l'enzyme sont des facteurs révélateurs de leur pouvoir inhibiteur. En vue d'approfondir cette analyse visuelle, les interactions des trois composés ont été regroupées dans le tableau 8 suivant.

Tableau 8. Récapitulatif des interactions impliquées dans le site actif de l'AChE par la galantamine et les deux hits **11288** et **10758**.

Cavité catalytique	Type d'interactions	Nombre d'interactions		
		Galantamine	11288	10758
PAS	π - π	0	5	2
	π -cation	0	0	0
	ionique	0	0	0
	hydrogène	0	1	1
	Total 1	0	6	3
CAS	π - π	1	1	0
	π -cation	2	0	1
	ionique	0	0	1
	hydrogène	1	1	0
	Total 2	4	2	2
CAS + PAS	T1+T2	4	8	5

Il ressort d'emblée de ce tableau que le nombre et la nature des interactions qui président à la stabilité des complexes formés par les trois composés **11288**, **10758** et la galantamine avec l'AChE seraient à l'origine de leur différence d'activité à l'égard de cette dernière. Il est utile de rappeler que parmi les différents types de liaisons faibles rencontrées, la liaison hydrogène est classée du point de vue énergétique comme étant relativement la plus forte (1-10 Kcal/mole) suivie par l'interaction ionique (3-4 Kcal/mole) puis par l'interaction π - π (2-4 Kcal/mole) et enfin vient l'interaction π -cation (1-2 Kcal/mole). Sur cette base, les complexes formés par les deux hits **11288** et **10758** apparaissent énergétiquement plus stables que la galantamine. En associant la nature de ces interactions au nombre total qu'implique avec l'AChE chacun des trois composés **11288**, **10758** et la galantamine soit respectivement huit, cinq et quatre interactions, on comprend mieux les résultats expérimentaux du tableau 7 où à juste titre, pour rappel, le hit **11288** se distingue par la plus forte activité inhibitrice en affichant la plus faible valeur de l'IC₅₀ soit 0.0473±0.0003 µM suivi du hit **10758** dont l'IC₅₀ équivaut à 0.1998±0.0147 µM puis vient enfin la galantamine dont l'IC₅₀ atteint 0.7739±0.0239 µM.

4. Etude de la similarité structurale

4.1. Les analogues structuraux des hits **11288** et **10758**

Les résultats prometteurs quant à la très forte activité des deux hits **11288** et **10758**, seize fois supérieure à celle de la galantamine dans le premier cas et quatre fois plus dans le deuxième cas ont particulièrement attirés notre attention dans ce travail et nous ont motivé à pousser plus loin nos investigations par une étude de similarité dont l'objectif serait la découverte d'autres molécules nouvelles qui s'apparenteraient aux mêmes familles chimiques respectives des isoindolo [2,1-a] indole et des bibenzofuranes avec un effet biologique plus actif que la galantamine. Conformément aux travaux de Atanasova, M. et *al* (2015), un pourcentage de similarité minimum de 70% a été utilisé pour faire ressortir de la chimiothèque de Curie quatre analogues structuraux dont l'un portant l'identifiant **11261** correspond au hit **11288** et les trois autres portant les identifiants **2**, **5** et **3033** correspondent au hit **10758**. Les structures moléculaires de ces analogues structuraux sont représentées dans la figure 34.

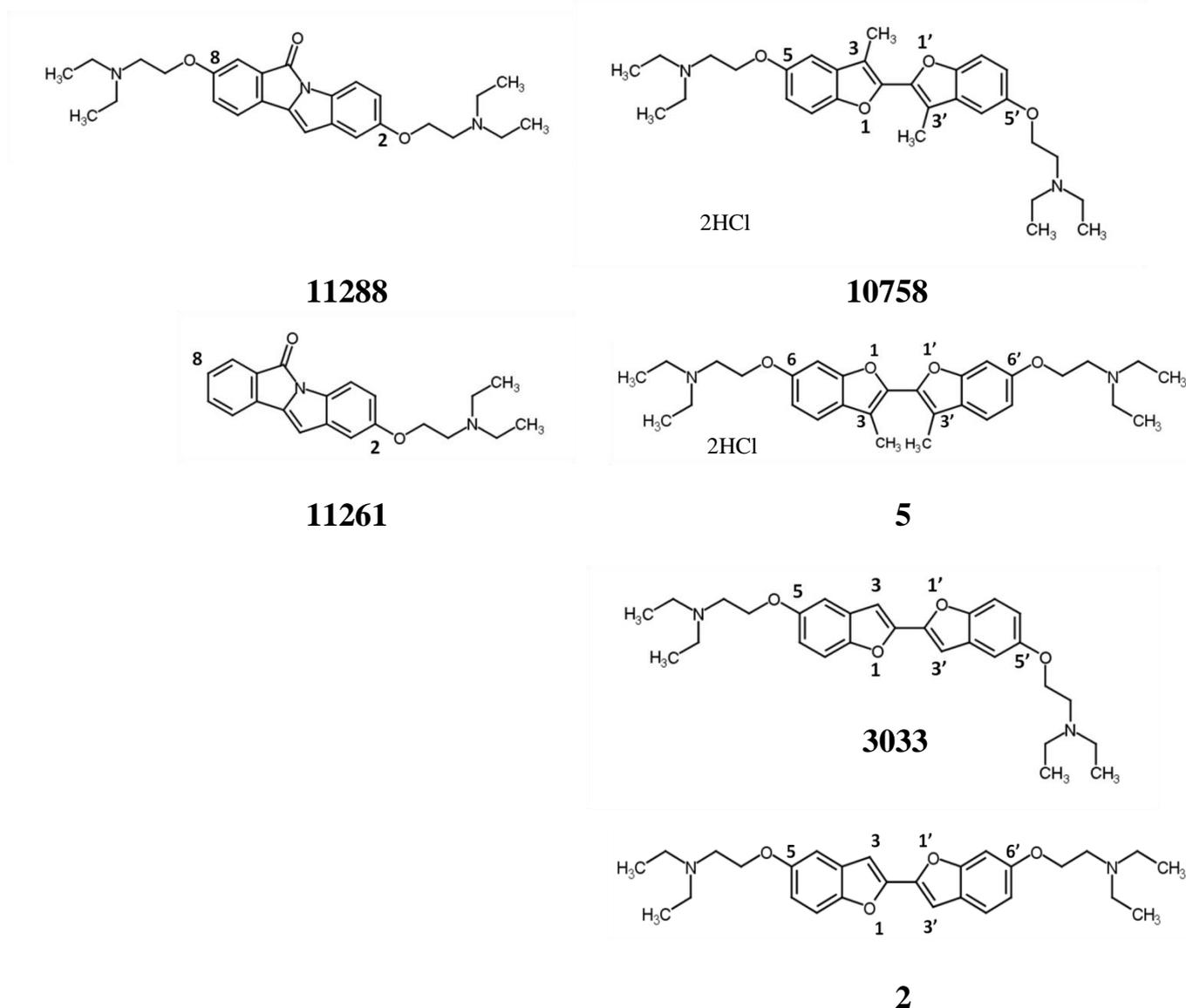


Figure 34. Structure chimique de **11288** et son analogue **11261** (à gauche), et de **10758** et ses analogues **5**, **3033** et **2** (à droite).

4.2. Evaluation expérimentale de l'activité anti-AChE des analogues structuraux

Comme précédemment, nous avons, dans un premier temps, déterminé d'abord le pourcentage d'inhibition des quatre analogues structuraux décrits plus haut, par la méthode d'Ellman, à la concentration de 100 μM (tableau 9).

Tableau 9. Valeurs du pourcentage d'inhibition à 100 μM des quatre analogues structuraux.

Analogues structuraux	Pourcentage d'inhibition (\pm SD) à 100 μM	Aspect
11261	97.93 \pm 2.51	incolore
2	97.35 \pm 1.04	incolore
5	97.63 \pm 1.81	incolore
3033	97.48 \pm 0.67	incolore
Galantamine	97.21 \pm 1,43	incolore

Il ressort de ce tableau que les quatre analogues structuraux des deux hits originels **11288** et **10758** affichent, à l'instar de ces derniers, des pourcentages d'inhibition à la concentration de 100 μM dépassant largement le seuil de 50% requis pour une bonne activité inhibitrice (Delogu, G.L. et *al.* 2016). En effet, avec des pourcentages d'inhibition atteignant 97%, les quatre analogues structuraux témoignent d'une forte activité inhibitrice à l'égard de l'AChE au moins équivalente à celle de la galantamine.

Dans un deuxième temps, la variation du pourcentage d'inhibition déterminée à neuf concentrations différentes (tableau 10), les mêmes que celles déjà utilisées précédemment (tableau 6), nous a permis de tracer les courbe dose-réponse correspondantes à nos quatre analogues structuraux (figure 35) à partir desquelles ont été déduites les valeurs de leur IC_{50} (tableau 11).

Tableau 10. Evaluation du pourcentage d'inhibition des quatre analogues structuraux à différentes concentrations.

Concentration (μM)		100	50	10	5	1	0.5	0.1	0.05	0.01
		Hits								
pourcentage d'inhibition moyen (\pm SD)	11261	97.93 \pm 2.51	95.97 \pm 0.79	93.97 \pm 0.75	85.28 \pm 0.94	57.52 \pm 1.26	46.88 \pm 2.58	27.69 \pm 2.26	13.76 \pm 1.55	5.21 \pm 1.69
	2	97.35 \pm 1.04	95.59 \pm 1.1	93.31 \pm 0.71	84.14 \pm 1.8	55.43 \pm 1.22	30.70 \pm 2.71	25.2 \pm 2.4	11.99 \pm 1.39	5.11 \pm 1.98
	5	97.63 \pm 1.81	96.30 \pm 1.01	94.06 \pm 0.18	90.52 \pm 1.9	66.68 \pm 1.77	53.07 \pm 0.01	29.64 \pm 1.23	14.87 \pm 1.91	7.75 \pm 1.54
	3033	97.48 \pm 0.67	95.58 \pm 0.79	90.04 \pm 0.66	84.88 \pm 0.81	56.12 \pm 1.55	38.85 \pm 1.49	26.69 \pm 2.15	12.14 \pm 1.57	5.88 \pm 1.45
	Galantamine	97.21 \pm 1.43	97.21 \pm 1.09	90.24 \pm 1.14	84.90 \pm 0.96	55.31 \pm 3.01	28.34 \pm 2.2	26.51 \pm 1.73	11.38 \pm 2.05	4.28 \pm 1.33

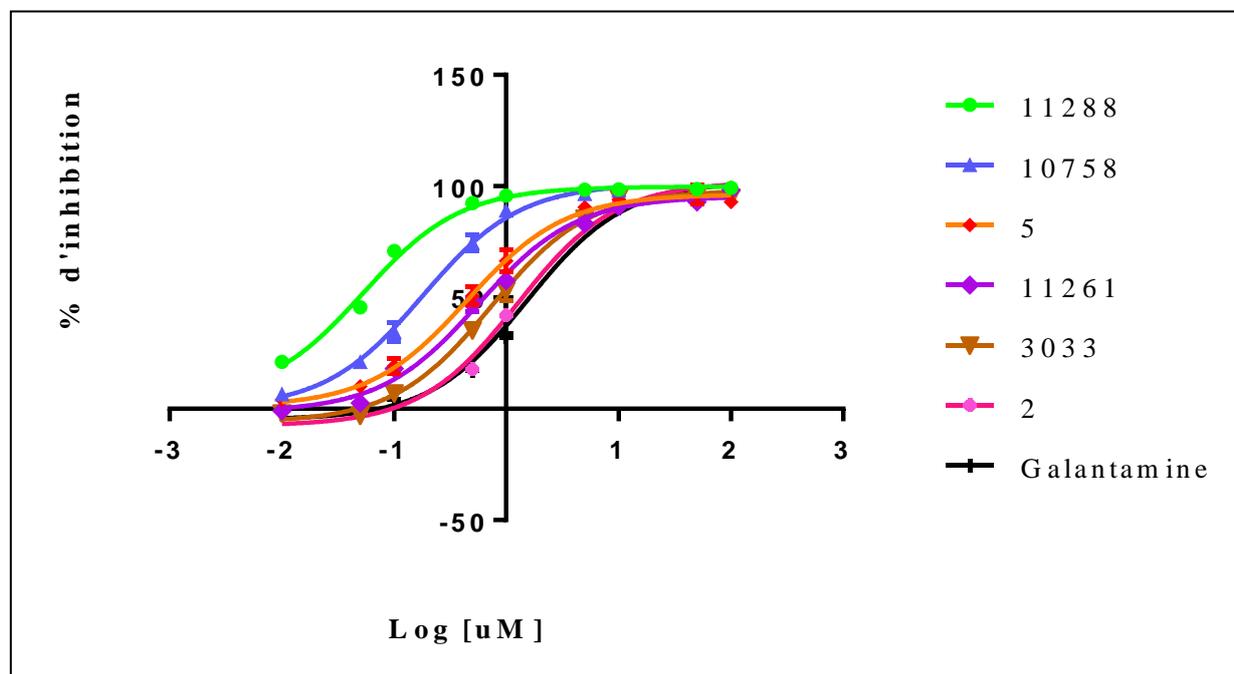


Figure 35. Courbes dose-réponse des quatre analogues structuraux.

Tableau 11. Valeurs des IC₅₀ des quatre analogues structuraux.

Analogues structuraux	IC₅₀± SD (µM) (n = 3)	Aspect
11261	0.5270±0.0460	incolore
2	0.7520±0.0090	incolore
5	0.4868±0.0180	incolore
3033	0.6170±0.02010	incolore
Galantamine	0.7739±0.0239	incolore

Le tableau montre que les IC₅₀ des quatre analogues structuraux **11261**, **2**, **5** et **3033**, en étant de loin inférieurs à la valeur seuil de 20 µM préconisée par Li, R.S. et *al.* (2013) pas seulement mais aussi à celle de la galantamine, peuvent de ce fait être classés dans le rang des inhibiteurs de l'AChE à très fort pouvoir inhibiteur. Cependant, il faut souligner que les IC₅₀ de ces composés restent toutefois nettement plus élevés que ceux des hits originels **11288** et **10758** qui jusque-là affichent toujours les valeurs les plus basses (tableau 7).

5. Évaluation qualitative et quantitative du criblage virtuel par vSDC

Si plusieurs études ont montré l'avantage en temps et argent de combiner le criblage virtuel et les tests expérimentaux pour identifier de nouvelles molécules bioactives, le rendement d'une telle approche reste cependant encore très faible nécessitant le plus souvent d'autres tests expérimentaux complémentaires parfois sur plusieurs dizaines ou centaines de molécules pour arriver à un nombre très restreint de molécules bioactives. Citons à ce titre les travaux de Di Giovanni, C. et *al.* (2016) qui n'ont pu aboutir, par criblage virtuel avec Glide d'une chimiothèque de 65000 molécules sur une cible anticancéreuse en l'occurrence le protéasome, qu'à l'identification expérimentale de sept nouveaux hits seulement sur quarante-cinq molécules sélectionnées virtuellement correspondant à un très faible rendement de près de 15 %. Un autre exemple est illustré par l'étude réalisée par Liu, M. et *al.* (2017) sur les inhibiteurs de la polymérase de l'influenza qui a pratiquement enregistré un même taux de 15 % correspondant à un rapport de quatre hits identifiés expérimentalement sur vingt-huit molécules retenues par le criblage virtuel d'une chimiothèque de 22 000 composés.

Dans notre étude sur l'inhibition de l'AChE, parmi les quatorze molécules sélectionnées par criblage virtuel d'une chimiothèque de près de 25000 composés, les tests *in vitro* nous ont permis d'identifier douze hits correspondant à un taux manifestement plus élevé atteignant 86 %. Mieux encore, parmi les 12 hits identifiés, six d'entre eux s'avèrent distinctement plus actifs que la galantamine. Cette nette amélioration des résultats tant du point de vue rendement que du point de vue activité revient à l'utilisation de la méthode vSDC qui est basée sur un consensus des résultats générés par les trois programmes de criblage virtuel Gold, Glide et Surflex.

En effet, cette dernière a pu, conformément à la littérature (Di Giovanni, C. *et al* 2016 ; Koyama, T. *et al* 2017), classer les douze hits identifiés plus haut, parmi les cent cinquante premières molécules de la chimiothèque de Curie qui correspond à un taux de sortie de 1% (figure 36).

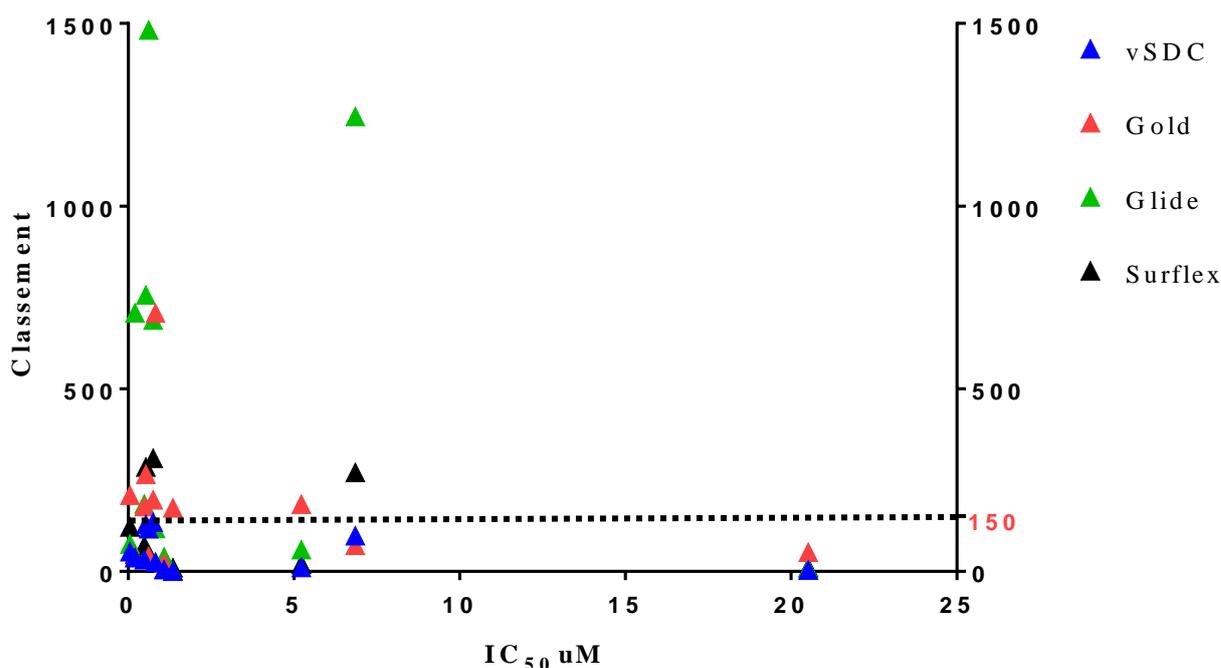


Figure 36. Classements des hits par vSDC (bleu), Glide (vert), Gold (rouge) et Surflex (noir) en fonction de leurs IC₅₀ expérimentales.

Considérés séparément, on constate que les trois programmes Gold, Glide et Surflex génèrent des classements et de scores différents où les hits cités plus haut se retrouvent pour la plupart en dehors du taux de 1% requis par la littérature (figure 36, tableau 12).

Tableau 12. Comparaison des classements des hits par les programmes vSDC, Glide, GOLD et Surflex

Hits	Classement des scores			
	vSDC	Glide	GOLD	Surflex
11288	54	75	209	122
10758	38	708	40	47
Galantamine	139	1565	1464	168
3039	26	118	707	24
16063	5	40	24	6
14369	1	1	174	10
3543	11	60	184	20
14751	98	1245	72	271
3553	4	8	53	11
11261	128	757	266	286
2	135	688	196	310
5	32	185	178	71
3033	117	1482	41	46

En effet, le tableau montre, pour un même hit, des résultats différents d'un programme à l'autre. À ce titre, l'exemple le plus frappant est illustré par les deux meilleurs inhibiteurs identifiés dans cette étude ; à savoir les deux hits **11288** et **10758** mais aussi l'inhibiteur de référence, la galantamine qui sont respectivement classés par Glide en 75^{ème}, 708^{ème} et 1565^{ème} positions ; par GOLD en 209^{ème}, 40^{ème} et 1464^{ème} positions et enfin par Surflex en 122^{ème}, 47^{ème} et 168^{ème} positions. En somme, le hit **11288** n'aurait jamais pu être sélectionné si le criblage virtuel avait été réalisé uniquement par Gold. De même, le hit **10758** n'aurait pas pu être trouvé si cette étude avait été réalisée uniquement par Glide. Grâce à la méthode vSDC, ces hits ainsi que tous les autres composés du tableau 12 se retrouvent rangés dans les

premières tranches du classement (1%) comme le montre l'exemple des deux hits précédents ainsi que la galantamine qui occupent respectivement les 54^{ème}, 38^{ème} et 139^{ème} positions.

En conclusion, l'application de la méthode vSDC aux résultats du criblage virtuel se révèle très fiable et efficace quant à la recherche et la découverte de nouvelles molécules biologiquement actives comme en témoigne les six inhibiteurs de l'AChE nouvellement identifiés par cette méthode et dont l'activité, nettement plus forte que celle de la galantamine, a été largement confirmée par les tests *in vitro*.

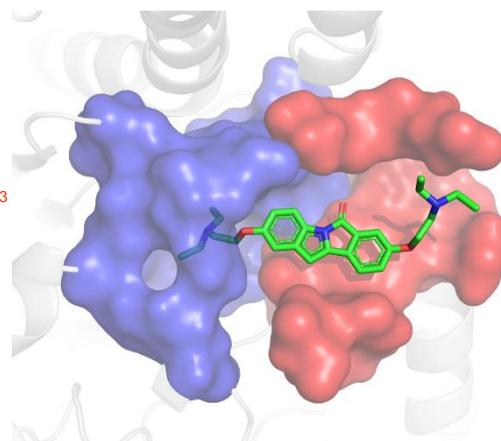
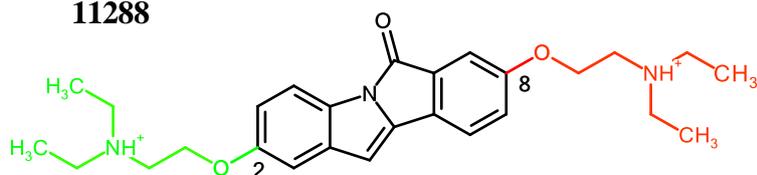
6. Relation structure-activité

Afin de mieux comprendre le fort potentiel inhibiteur que recèlent les deux hits **11288** et **10758**, nous avons jugé utile d'entreprendre une inspection visuelle de leur mode d'interaction avec l'AChE en comparaison avec leurs analogues structuraux respectifs. Une telle étude aura pour but de nous aider à déterminer les éléments essentiels de la structure moléculaire qui président à la très forte et importante activité inhibitrice de ces deux hits.

6.1. Etude comparative des modes d'interaction avec l'AChE du hit 11288 et de son analogue structural 11261

Il est utile de rappeler que selon les résultats expérimentaux des tableaux 7 et 11, le hit **11288** qui s'apparente à la famille chimique des isoindolo [2,1-a] indole présente un IC_{50} de $0.0473 \pm 0.0003 \mu M$ caractéristique d'une activité anti-AChE plus de onze fois supérieure que celle de son analogue structural **11261** dont l' IC_{50} s'élève à $0.5270 \pm 0.0460 \mu M$. Cette différence d'activité semble être directement liée à la perte chez l'analogue structural **11261** du radical (2-(diéthylamino) éthoxy) sur le C8 entraînant, par rapport au hit originel **11288**, une diminution de la longueur de la molécule qui l'empêcherait d'atteindre le CAS de l'enzyme favorisant son positionnement plutôt dans le PAS (figure 37).

11288



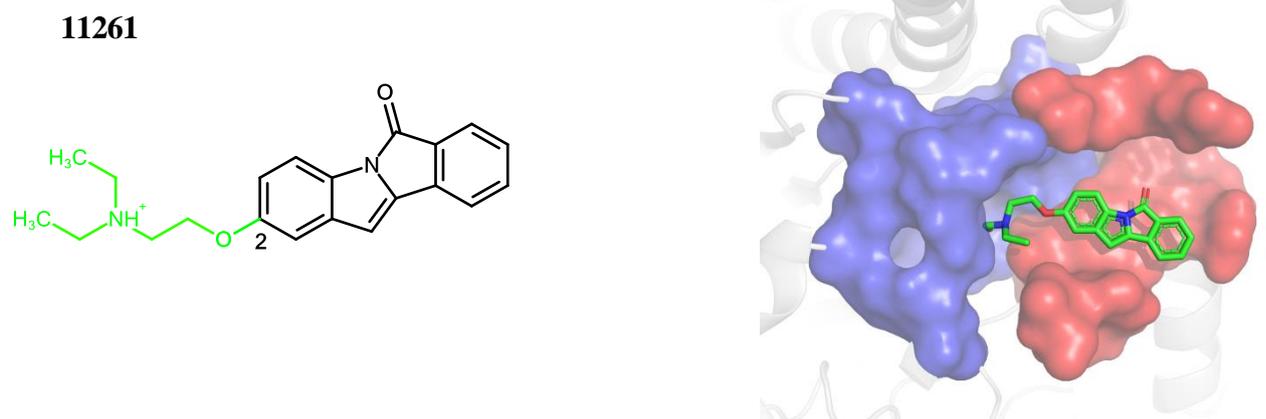


Figure 37. Structures et modes de positionnement du hit **11288** et de son analogue structural **11261** dans les sites PAS (en rouge) et CAS (en bleu) de la cavité catalytique de l'AChE.

Une analyse visuelle plus approfondie du mode de positionnement de l'analogue structural **11261** dans le PAS de l'AChE montre la mise en place de sept interactions dont six de type π - π avec les résidus Trp286, Tyr72 et His287 et une liaison H via son groupement aminium avec le résidu Tyr124 (figure 38).

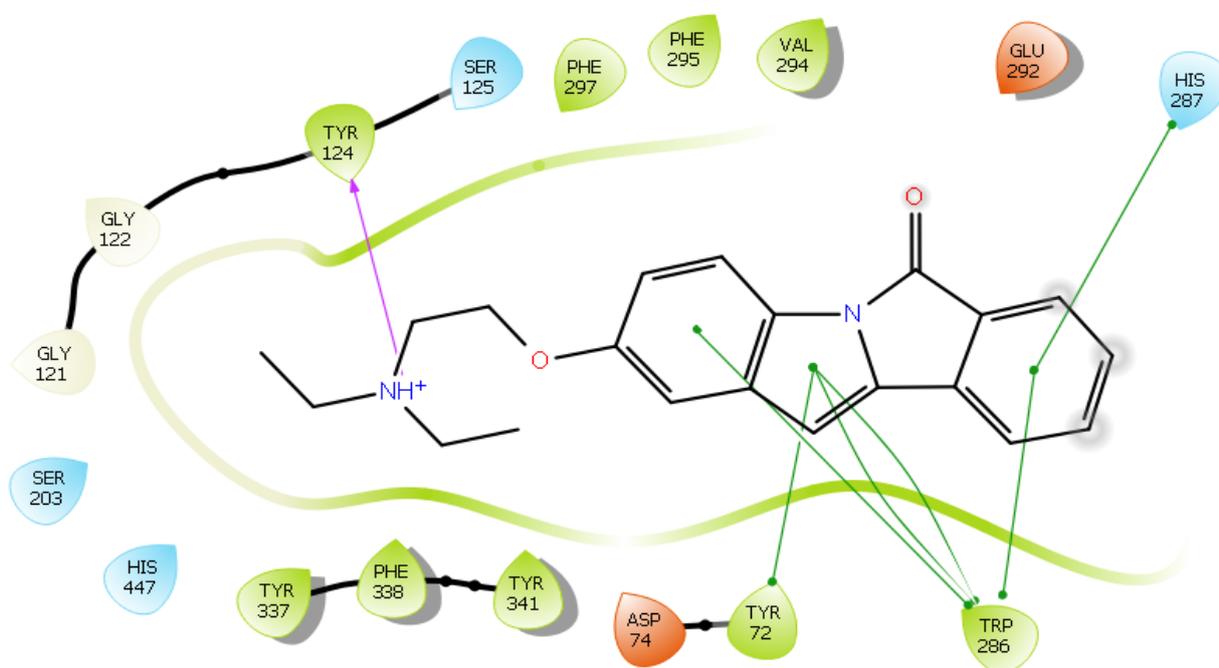


Figure 38. Mode d'interaction de l'analogue **11261** dans le site PAS de l'AChE. Les interactions sont représentées avec les mêmes couleurs que dans la figure 33.

Afin d'approfondir notre analyse comparative entre le hit originel **11288** et son analogue structural **11261**, nous avons jugé utile de regrouper les interactions de la figure 38 dans le tableau 13 suivant :

Tableau 13. Récapitulatif des interactions impliquées dans le site actif de l'ACHé par le hit **11288** et son analogue structural **11261**.

Cavité catalytique	Type d'interactions	Nombre d'interactions	
		11288	11261
PAS	π - π	5	6
	π -cation	0	0
	ionique	0	0
	hydrogène	1	1
	Total 1	6	7
CAS	π - π	1	0
	π -cation	0	0
	ionique	0	0
	hydrogène	1	0
	Total 2	2	0
CAS + PAS	T1+T2	8	7

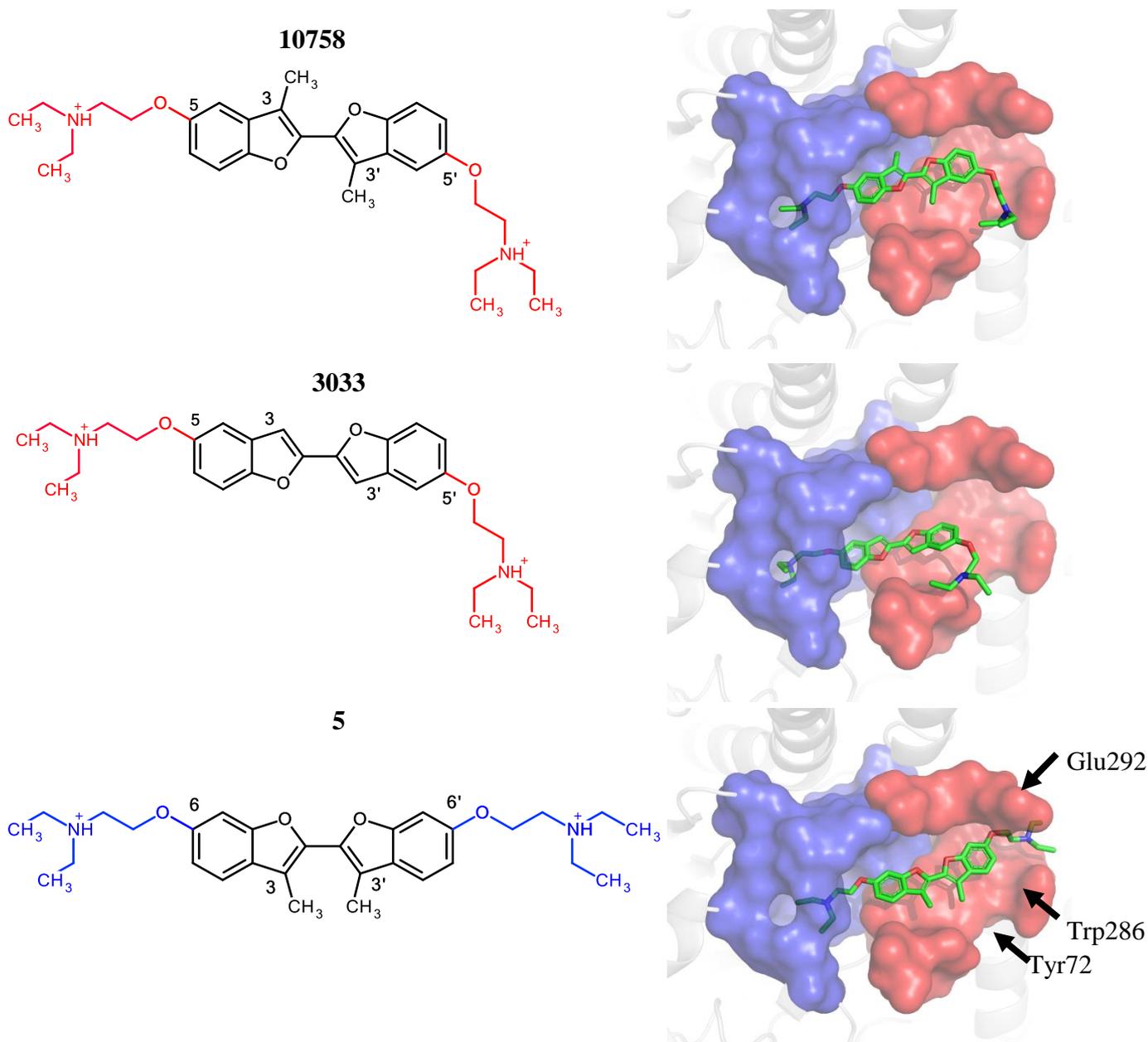
Bien qu'impliquant dans le site actif de l'enzyme des interactions de même nature que le hit **11288**, l'activité de l'analogue **11261** se révèle onze fois plus faible que celle du hit originel **11288** en raison vraisemblablement de l'absence sur son C8 du radical (2-(diéthylamino) éthoxy) qui dans le cas de ce dernier joue un rôle prépondérant en mettant en jeu via son groupement aminium, une liaison H avec le résidu His447 qui est, rappelons-le, l'un des résidus les plus importants de la triade catalytique du site CAS de l'enzyme.

6.2. Etude comparative des modes d'interaction avec l'ACHé du hit **10758** et de ses analogues structuraux **2**, **5** et **3033**

Du point de vue structural, le hit **10758** et ses trois analogues structuraux **2**, **5** et **3033** appartiennent à la famille des bibenzofuranes. Les quatre composés se distinguent par la présence sur leur structure de base, de deux substituants [2-(diéthylamino) éthoxy] qu'on retrouve dans différentes positions, soit en 5,5' (hits **10758** et **3033**), soit en 5,6' (hit **2**), ou

encore en 6,6' (hit **5**). L'autre caractéristique de ces composés est la présence de deux groupements méthyle en 3,3' (hits **10758** et **5**) ou leur absence (hits **2** et **3033**) (figure 39).

Concernant le hit originel **10758**, lors de son interaction avec l'enzyme, les deux noyaux benzofuranes adoptent une position opposée, du fait de leur libre rotation autour de la simple liaison qui les relie, plaidant en faveur d'une conformation très stable au sein de la cavité catalytique de cette dernière (figure 39).



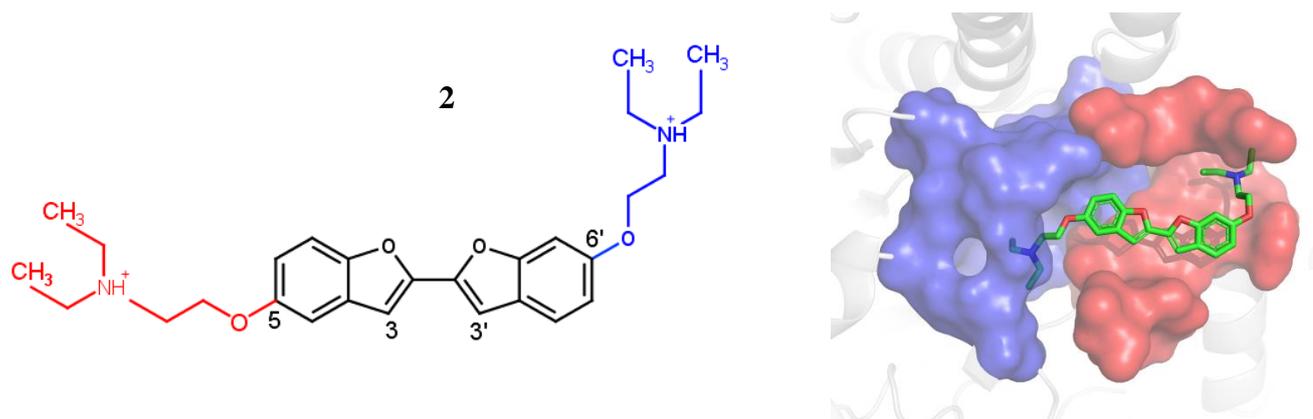
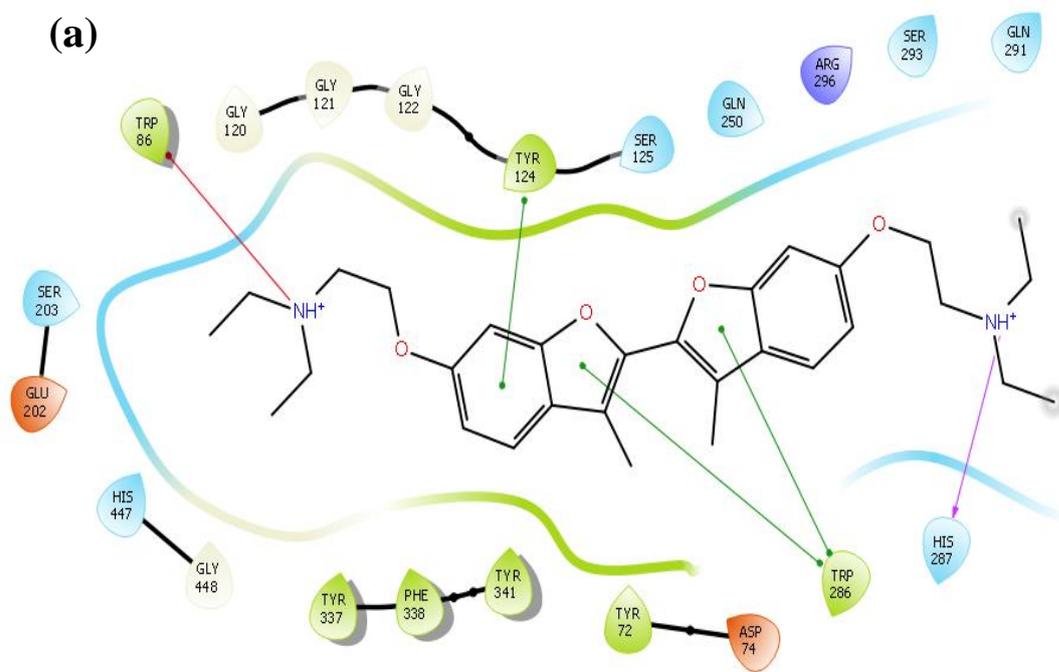


Figure 39. Structures et modes de positionnement dans le site actif de l'AChE du hit **10758** et de ses trois analogues structuraux **2**, **5** et **3033**

Un tel mode de positionnement est le témoin d'une très forte activité inhibitrice du hit **10758** qui s'exprime par un IC_{50} d'une très faible valeur de $0.1998 \mu\text{M}$ (tableau 7) impliquant dans le site actif de l'enzyme cinq interactions différentes dont trois sont situées dans le PAS et les deux autres dans le CAS (figure 33 et tableau 8).

L'étude comparative du mode d'interaction avec l'AChE du hit **10758** et de ses trois analogues structuraux **2**, **5** et **3033** fut menée à partir de la figure 40 suivante.



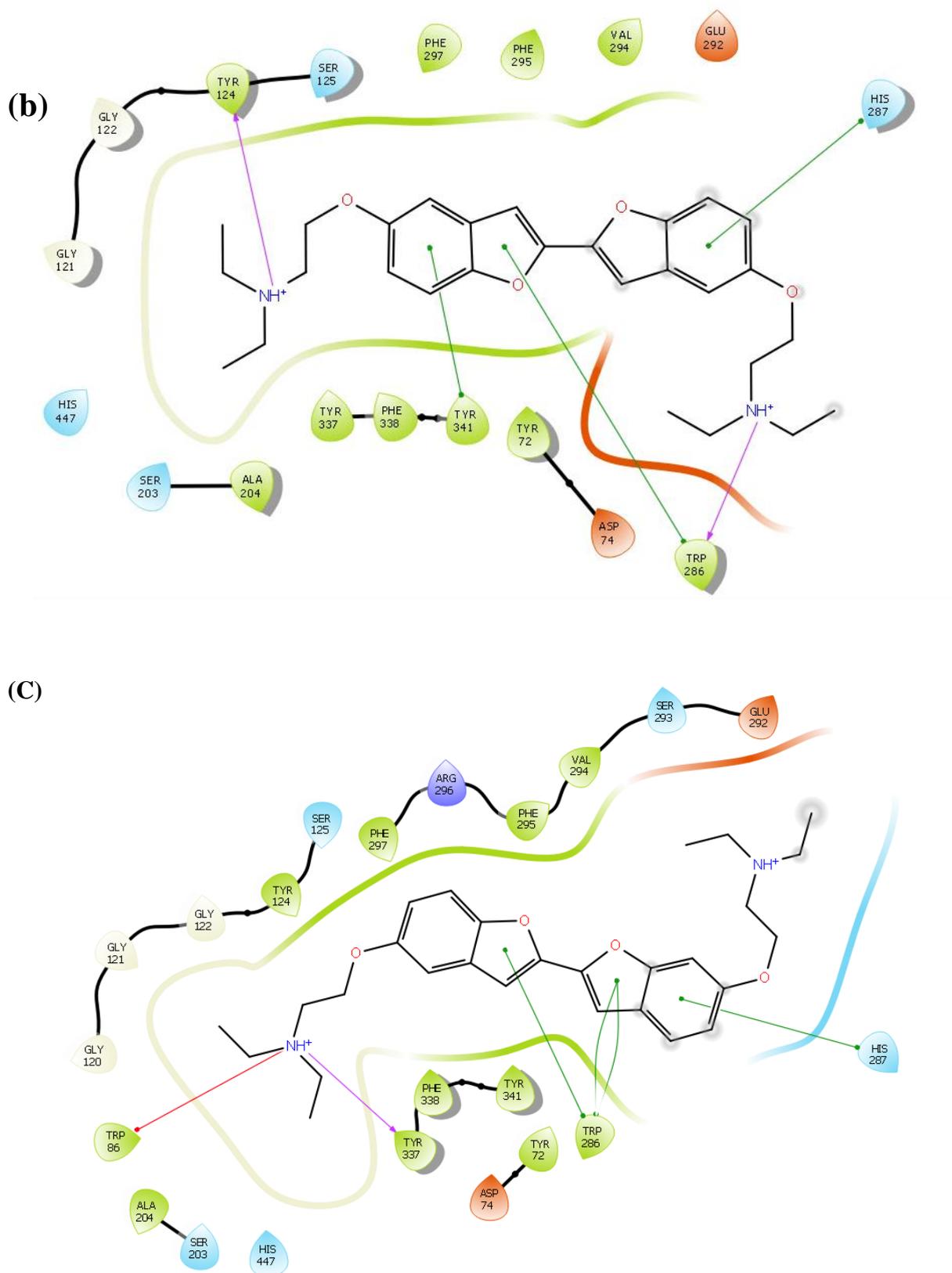


Figure 40. Modes d'interactions des trois analogues structuraux **5** (a), **3033** (b) et **2** (c) avec le site actif de l'AChE.

La nature, le nombre et le lieu des interactions de chaque composé dans le PAS ou le CAS de l'enzyme ont été déterminés et regroupés dans le tableau 14 suivant.

Tableau 14. Récapitulatif des interactions impliquées dans le site actif de l'AChE par le hit **10758** et ses trois analogues structuraux **2**, **5** et **3033**.

Cavité catalytique	Type d'interactions	Nombre d'interactions			
		10758	3033	5	2
PAS	π - π	2	3	3	4
	π -cation	0	0	0	0
	ionique	0	0	0	0
	hydrogène	1	2	1	0
	Total 1	3	5	4	4
CAS	π - π	0	0	0	0
	π -cation	1	0	1	1
	ionique	1	0	0	0
	hydrogène	0	0	0	1
	Total 2	2	0	1	2
CAS+PAS	T1+T2	5	5	5	6

L'analyse comparative des interactions des trois analogues structuraux du hit **10758** a été réalisée dans l'ordre décroissant de leur pouvoir inhibiteur (tableau 11). Dans le cas de l'analogue structural **5**, la baisse de l'activité inhibitrice ($IC_{50} = 0.4868 \pm 0.0180 \mu M$) par rapport au hit **10758** ($IC_{50} = 0.1998 \pm 0.0147 \mu M$) est vraisemblablement liée au changement de position des deux radicaux [2- (diéthylamino) éthoxy] en 6,6' qui confère à la molécule une géométrie plane et une symétrie verticale où, contrairement au hit de départ, ces deux derniers se trouvent situés d'un même côté et les deux groupements méthyle en 3,3' de l'autre côté de la simple liaison qui relie les 2 noyaux benzofuranes. Une telle configuration semble engendrer au niveau du site actif de l'enzyme un encombrement stérique qui contraint la molécule de prendre une position inclinée dirigée vers la partie supérieure du PAS et l'empêche d'adopter la même conformation courbée que le hit **10758** avec un radical [2- (diéthylamino) éthoxy] en 5' orienté vers le bas en guise de complémentarité avec la structure de l'enzyme. En effet, l'analogue structural **5** adopte une position différente dont le radical [2- (diéthylamino) éthoxy] en 6' se trouve dirigé en ligne droite vers l'entrée du PAS. Ceci

affecte l'activité de la molécule qui diminue considérablement par rapport au hit **10758** de départ. La figure 40 montre que l'analogue structural **5** comme le hit originel **10758** développe également cinq interactions dont quatre sont situées dans le PAS et une dans le site CAS. Dans le PAS, trois interactions de type π - π sont formées avec les deux résidus Trp286 et Tyr341 et une liaison hydrogène est créée entre l'aminium du radical [2- (diéthylamino) éthoxy] en 6' et le résidu His287. Au niveau du CAS une interaction de type π -cation est établie entre l'autre aminium de la molécule, situé en position 6 et le résidu Trp86. Bien que les deux composés impliquent un même nombre d'interactions dans les deux sites PAS et CAS de la cavité catalytique de l'AChE, le hit originel **10758** se distingue par une activité inhibitrice plus élevée que celle de son analogue structural **5** en raison notamment de l'interaction ionique qu'il développe dans le site CAS avec le résidu Glu202 qui, rappelons-le, joue un rôle crucial dans la stabilisation des états de transition lors de la catalyse du substrat par l'AChE (Wandhammer, M. 2012). L'autre élément non moins important qui semble également présider à la forte activité inhibitrice du hit originel **10758** et qu'on ne retrouve pas chez l'analogue structural **5**, est la présence de la liaison hydrogène qu'il forme dans le PAS avec une molécule d'eau qui elle-même forme deux autres liaisons hydrogène avec les deux résidus Ser293 et Arg296. Ce type particulier d'interactions serait vraisemblablement à l'origine d'une bonne et meilleure stabilité du complexe enzyme-inhibiteur formé, témoin d'une très forte activité inhibitrice du hit originel **10758** voire du hit **11288** où également la même particularité est observée.

Quant à l'analogue structural **3033**, la baisse de son pouvoir inhibiteur ($IC_{50} = 0.6170 \pm 0.02010 \mu M$) par rapport au hit **10758** de départ, semble être liée à l'absence sur la molécule des deux méthyles en 3,3'. L'analyse visuelle révèle que le composé adopte dans le site actif de l'enzyme une même conformation que le hit **10758** de départ avec par contre une localisation uniquement dans le PAS où il développe un même nombre d'interactions. On y distingue trois interactions de type π - π avec les résidus Trp286, Tyr 341 et His287 et deux liaisons hydrogène avec les résidus Trp286 et Tyr 124 via ses deux groupements aminium en 5,5' (figure 40). Ainsi, il ressort clairement à travers cette analyse visuelle de l'analogue structural **3033**, que l'absence totale d'interactions avec le CAS et des deux liaisons hydrogène avec les résidus Ser293 et Arg296 que forme le hit originel **10758** via la liaison hydrogène avec une molécule d'eau dans le PAS seraient à l'origine de la chute de son activité inhibitrice à l'égard de l'AChE.

Enfin, concernant l'analogue structural **2**, la forte baisse de son activité anti-AChE ($IC_{50} = 0.7520 \pm 0.0090 \mu M$) par rapport au hit originel **10758**, revient certainement au changement de position en 6' du radical [2- (diéthylamino) éthoxy] ainsi qu'à la perte des deux groupements méthyle en 3,3'. Dans le site actif de l'enzyme, l'analogue structural **2** adopte, en raison probablement de l'absence des deux groupements méthyle en 3,3' à l'origine d'un encombrement stérique, un mode de positionnement incliné différemment vers le haut du PAS et où contrairement au hit originel **10758**, le radical [2- (diéthylamino) éthoxy] en 6' se trouve courbé et orienté vers le haut en direction de l'entrée de ce site. Bien qu'apparaissant comme l'analogue structural activement le plus faible en raison de la forte valeur de son IC_{50} ($0.7520 \mu M$), ce dernier établit paradoxalement six interactions dont quatre sont situées dans le PAS et les deux autres dans le site CAS. Les quatre interactions du PAS sont de type π - π dont trois sont particulièrement établies avec le même résidu Trp286 et une autre avec le résidu His287. Dans le site CAS, l'ion aminium du radical [2- (diéthylamino) éthoxy] situé en position 5 de la molécule forme une interaction de type π -cation avec le résidu Trp86 et une autre liaison de type hydrogène avec le résidu Tyr337.

La forte baisse de l'activité de l'analogue structural **2** par rapport au hit **10758** pourrait s'expliquer essentiellement par l'absence totale de liaison hydrogène dans le PAS de l'enzyme notamment celle que forme le hit originel **10758** avec la molécule d'eau mais aussi par l'inexistence de l'interaction ionique qu'il implique dans le CAS avec le résidu Glu202.

Il ressort de cette analyse visuelle que la présence des deux substituants [2- (diéthylamino) éthoxy] en 5,5' et des deux méthyles en 3,3' sur la structure de base du hit **10758** joue un rôle primordial quant à sa très forte activité à l'égard de l'AChE qui diminue considérablement en cas de perte ou de changement de position de ces radicaux tel que constaté avec les analogues structuraux **2**, **5** et **3033** étudiés ci-haut.

6.3. Comparaison du mode d'interaction de la galantamine et des analogues structuraux 11261, 2, 5 et 3033

Afin de mettre en exergue les éléments susceptibles d'expliquer le potentiel inhibiteur plus élevé que la galantamine des quatre analogues structuraux **11261**, **2**, **5** et **3033** étudiés plus haut, il nous a semblé judicieux de procéder à une étude comparative des interactions impliquées par chaque composé avec le site actif de l'AChE en les regroupant dans le tableau 15 suivant.

Tableau 15. Récapitulatif des interactions impliquées dans le site actif de l'AChE par la galantamine, le hit **11288** et son analogue structural **11261**

Cavité catalytique	Type d'interactions	Nombre d'interactions				
		Gal	11261	3033	5	2
PAS	π - π	0	6	3	3	4
	π -cation	0	0	0	0	0
	ionique	0	0	0	0	0
	hydrogène	0	1	2	1	0
	Total 1	0	7	5	4	4
CAS	π - π	1	0	0	0	0
	π -cation	2	0	0	1	1
	ionique	0	0	0	0	0
	hydrogène	1	0	0	0	1
	Total 2	4	0	0	1	2
CAS+PAS	T1+T2	4	7	5	5	6

Il se dégage clairement de ce tableau que relativement à la galantamine, le nombre plus important d'interactions qu'impliquent les quatre analogues structuraux dans le PAS leur confère une meilleure stabilité et par conséquent une meilleure activité inhibitrice. Les travaux de Johnson, G. et *al* (2006) montrent à juste titre que le PAS est considéré comme cible potentielle dont l'inhibition empêcherait l'entrée du substrat dans le site actif engendrant une diminution significative de l'activité de l'AChE.

7. Prédiction des propriétés ADMET

Un bon candidat médicament doit être, non seulement actif, mais aussi capable d'atteindre sa cible dans l'organisme avec la concentration nécessaire pour assurer la fonction biologique escomptée sans effets toxiques. À ce titre, les résultats prometteurs des tests *in vitro* réalisés sur les six hits **11288**, **10758**, **11261**, **2**, **5** et **3033** ont été complétés par une analyse *in silico* prédictive de leurs propriétés ADMET notamment leurs différentes propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques ainsi que leur toxicité potentielle.

7.1. Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physicochimiques des six hits cités plus haut ont été évaluées conformément aux règles de Lipinski et de Veber (tableau 16).

Tableau 16. Propriétés physicochimiques des hits **11288**, **10758**, **11261**, **5**, **3033**, **2** et de la galantamine.

Propriétés	11288	10758	11261	2	5	3033	Galantamine
Formule	C ₂₇ H ₃₇ N ₃ O ₃	C ₃₀ H ₄₂ N ₂ O ₄	C ₂₁ H ₂₃ N ₂ O ₂	C ₂₈ H ₃₈ N ₂ O ₄	C ₃₀ H ₄₂ N ₂ O ₄	C ₂₈ H ₃₈ N ₂ O ₄	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃
PM (g/mol)	451.60	494.67	335.42	466.61	494.67	466.61	287.35
nLF	12	13	6	13	13	13	1
nON	3	4	2	4	4	4	4
nOHNH	2	2	1	2	2	2	1
Log P	2.49	3.86	2.78	3.28	3.9	3.29	1.91
TPSA Å²	49.34	53.62	35.67	53.62	53.62	53.62	41.93
Règle de Lipinski	Parfaitement conforme	Parfaitement conforme					
Règle de Veber	Parfaitement conforme	Parfaitement conforme					
Solubilité dans l'eau	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible	Moyenne
Accessibilité à la synthèse	3.94	4.49	2.99	4.31	4.62	4.1	4.57

Les résultats du tableau montrent que les hits étudiés, en répondant favorablement aux critères de sélection de Lipinski et Veber, témoignent de leur bonne biodisponibilité s'ils sont administrés par voie orale. En se référant particulièrement au critère Log P dont les valeurs sont toutes situées dans l'intervalle requis par la règle de Lipinski entre -2 et 5, il ressort la bonne aptitude de ces hits à se dissoudre dans les phases aqueuses de l'organisme et à traverser les membranes lipidiques pour atteindre leur lieu d'action. Paradoxalement, ces hits répondent par un faible résultat à l'autre critère du tableau inhérent à la solubilité dans l'eau.

Par contre, leur synthèse semble être plus facile à mettre en œuvre comme en témoigne leurs faibles valeurs toutes inférieures à 5 sur l'échelle d'accessibilité à la synthèse qui indique que la difficulté de synthèse va crescendo de la valeur 1 à 10. Dans ce cas, le paradoxe relevé plus haut quant à leur faible solubilité dans l'eau pourra alors être résolu lors de l'étape d'optimisation de ces hits en *leads* par modification de leurs structures de départ soit en ajoutant ou en éliminant certains substituants.

7.2. Propriétés pharmacocinétiques

Ayant passé avec succès l'étape d'évaluation des propriétés physicochimiques de Lipinski et Veber, les six hits doivent, pour être admis en tant que candidat-médicament, également répondre favorablement aux critères suivants inhérents à leurs propriétés pharmacocinétiques ADME (tableau 17).

Tableau 17. Caractéristiques pharmacocinétiques des hits **11288, 10758, 11261, 2, 5, 3033** et de la galantamine.

propriétés	11288	10758	11261	2	5	3033	Galantamine
AGI	élevée						
P- Caco-2	56.3883	26.8246	56.9903	23.9698	22.7661	27.1107	20.9301
PHE	élevée						
I- CYP1A2	Négative	Négative	Positive	Négative	Négative	Négative	Négative
I-CYP2C19	Négative						
I-CYP2C9	Négative	Négative	Positive	Négative	Négative	Négative	Négative
I-CYP2D6	Négative	Négative	Positive	Négative	Négative	Négative	Positive
I-CYP3A4	Négative						

AGI : Absorption Gastro-Intestinale ; CYP : Cytochrome P450 ; PHE : Perméabilité Hémato-Encéphalique ; P : Perméabilité ; I : Inhibition

Il ressort du tableau que la perméabilité gastro-intestinale des six hits est tout autant élevée que celle de la galantamine témoignant d'un passage facile à travers la paroi intestinale

pour arriver à la circulation générale. Le test suivant reposant sur l'utilisation de lignées cellulaires humaines d'origine intestinale de type Caco-2 confirme pleinement cette bonne perméabilité intestinale. En effet, les six hits enregistrent des valeurs de perméabilité cellulaire nettement plus élevées que celles de la galantamine notamment dans le cas du hit **11288** et de son analogue structural **11261**.

On note également chez ces hits comme chez la galantamine, une forte capacité à franchir la barrière hémato-encéphalique. Ceci constitue à l'évidence un atout majeur pour ces hits qui présentent l'avantage dans le cas des pathologies touchant le système nerveux central comme la MA d'atteindre très facilement leur cible d'action telle que l'enzyme AChE qui nous intéresse dans le présent travail.

Enfin, concernant les cytochromes P450, il apparaît que tous les hits adoptent un comportement négatif à leur égard sauf l'analogue structural **11261** qui inhibe simultanément les trois enzymes CYP1 A2, CYP2 C9 et CYP2 D6 de ce complexe multienzymatique. À priori, cette inhibition ne semble pas avoir de conséquences fâcheuses sur le métabolisme des médicaments car on constate fort heureusement que le CYP3A4 est épargné. C'est notamment par l'intermédiaire de ce dernier que sont métabolisés au niveau du foie la plupart des médicaments chez l'homme. Son inhibition aurait pour conséquence un ralentissement de l'élimination du médicament avec une élévation de sa concentration plasmatique et un risque accru de survenue d'effets indésirables. Quant aux autres CYP cités plus haut, il reste encore la possibilité de lever leur inhibition par le processus d'optimisation de la structure du hit **11261** responsable de cette anomalie.

7.3. Toxicité potentielle

L'étude de la toxicité potentielle est une autre étape que doivent également franchir avec succès les hits étudiés avant leur admission comme candidat-médicament. Dans cette perspective, différents aspects de cette toxicité potentielle ont été traités dans cette étude prédictive (tableau 18).

Tableau 18. Toxicité potentielle des hits **11288**, **10758**, **11261**, **2**, **5**, **3033** et de la galantamine.

Tests	11288	10758	11261	2	5	3033	Galantamine
Test d'Ames	non-mutagène	non-mutagène	mutagène	non-mutagène	mutagène	mutagène	Non-mutagène
Cancérogénicité pour les souris	négative	négative	positive	négative	négative	négative	Négative
Cancérogénicité pour les rats	positive	positive	positive	positive	positive	positive	négative
Inhibition de hERG	risque médium	risque faible					
Algue	0.00371	0.00136	0.01450	0.01288	0.00434	0.01366	0.10011
Daphnia	0.00520	0.00129	0.01526	0.01698	0.00763	0.01698	0.55373
Médaka	7.6641e-005	5.13199e-006	0.00053	0.00069	0.00015	0.00069	0.41111
Minnow	0.00019	9.35189e-006	0.00105	0.00278	0.00047	0.00277	0.55802

D'emblée, il ressort du tableau que les résultats des six hits sont mitigés par rapport à la galantamine qui elle répond favorablement à tous les tests. Concernant le test d'Ames, on constate que seuls les trois hits **2**, **11288** et **10758** qui, à l'instar de la galantamine, ne présentent aucun pouvoir mutagène. Si leur effet non cancérigène est également confirmé par les résultats négatifs du test avec les souris, il est au contraire infirmé par des résultats positifs avec les rats. Les hits **5**, **11261** et **3033** montrent en plus de leur effet mutagène, un pouvoir cancérigène variable selon qu'il s'agisse de rats ou de souris. En effet, le hit **11261** se distingue par un pouvoir cancérigène à l'égard des deux types de rongeurs alors que les deux hits **5** et **3033** comme les deux hits **11288** et **10758** ne sont cancérigènes qu'envers les rats.

Quant à l'inhibition du gène hERG, ce sont les six hits qui présentent un risque médium comparativement à la galantamine qui montre un faible risque. Pour rappel, le gène hERG est responsable de la synthèse des protéines formant le canal potassique dont l'inhibition pourrait être à l'origine d'une fibrillation entraînant un malaise voire un arrêt cardiaque.

La toxicité potentielle aiguë a enfin été simulée sur quatre espèces aquatiques différentes dont l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata*, le crustacé planctonique *Daphnia magna* Straus et deux larves de poisson *Oryzias latipes* (medeka) et *Pimephales promelas*

(*minnow*). Il ressort des résultats du tableau 18 que, relativement à la galantamine, les six hits se révèlent très faiblement toxiques à l'égard des quatre espèces marines étudiées.

Bien que certains résultats paraissent ici contradictoires, l'étude *in silico* demeure d'une grande utilité au vu des renseignements préliminaires obtenus sur la toxicité de nos produits pourtant qualifiés par les tests *in vitro* comme relativement plus actifs que la galantamine à l'égard de l'AChE. Cependant, il faut souligner que l'effet toxique de nos hits que révèle cette étude théorique ne peut être réellement pris en compte qu'après confirmation par de nombreux tests *in vivo*.

8. Evaluation *in vivo* de la toxicité aiguë sur les larves d'*Artemia salina*

La toxicité des six hits identifiés dans ce travail et de la galantamine a été évaluée par le pourcentage de mortalité ou CL₅₀ des larves de l'espèce crustacé *Artemia salina* à différentes concentrations de ces produits (tableau 19). L'absence malheureusement de larves vivantes inhérentes aux quatre espèces aquatiques déjà utilisées dans l'étude de la toxicité potentielle *in silico* (tableau 18) nous a contraint d'orienter notre choix sur d'autres espèces vivantes disponibles au laboratoire telles que *Artemia salina* pour réaliser notre étude de la toxicité aiguë *in vivo*.

Tableau 19. Taux de mortalité des larves d'*Artemia salina* exprimé en CL₅₀.

Concentration (µM)	11288	10758	11261	2	5	3033	Galantamine
Blanc	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0.01	0±0	17.36±1.86	0±0	0±0	7.14±1.86	0±0	0±0
0.05	5±3.33	23.61±1.38	0±0	5±0	7.14±1.86	5±0	0±0
0.1	5±3.33	29.16±1.16	0±0	5±0	21.42±1.16	5±3.33	0±0
0.5	5±3.33	35.41±1.08	5±3.33	10±3.33	21.42±1.86	5±3.33	10±3.33
1	10±0	46.52±1.02	5±3.33	25±3.33	35.71±1.38	10±3.33	10±0
5	40±0	49.02±0.47	5±0	45±3.33	50±0	10±3.33	25±3.33
10	45±3.33	58.33±1.33	5±3.33	55±6.66	50±0	15±3.33	45±3.33
50	50±6.66	64.85±1.08	15±3.33	70±3.33	64.28±1.38	30±6.66	45±3.33
100	60±0	70.13±0.63	35±3.33	80±3.33	78.57±1.86	30±0	65±6.66
CL₅₀± SD	54.4±3.1	6.88±0.53	≥100	34.95±1.2	7.28±0.79	≥100	50.4±2.22

Il ressort de ce tableau que la mortalité des larves est proportionnelle à la concentration du produit étudié : plus la concentration du produit augmente plus le pourcentage de mortalité des larves augmente. Cependant, ce pourcentage n'atteint jamais la valeur de 100 % quel que soit le produit étudié et quelle que soit sa concentration témoignant de la faible toxicité de nos hits à l'égard des larves d'*Artemia salina*.

À partir des valeurs de ce tableau, une représentation graphique a été conçue pour chaque hit montrant l'évolution du pourcentage de mortalité des larves en fonction de la variation de la concentration (figure 41).

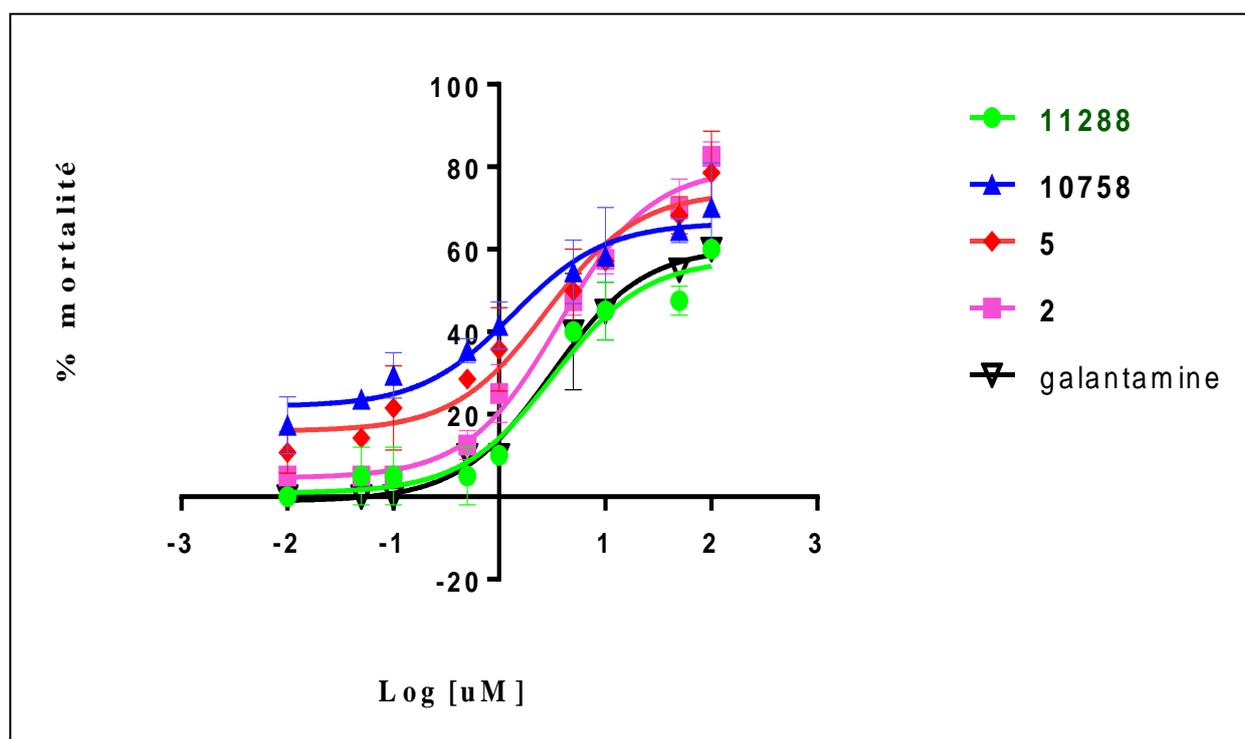


Figure 41. Courbes dose-réponse des hits étudiés montrant l'évolution du pourcentage de mortalité des larves d'*Artemia salina*.

Ces courbes dose-réponse nous ont permis de déterminer directement la valeur de la CL_{50} de chaque hit que nous avons reportée dans le tableau 19 ci-dessus.

Afin de mieux appréhender les éléments qui président à leur toxicité potentielle, nous avons jugé utile de diviser les six hits en deux groupes différents suivant leur appartenance chimique. Dans le cas de la famille des isoindolo [2,1-a] indole, le hit **11288** présente une CL_{50} d'une valeur de 54.4 μ M légèrement supérieure à celle de la galantamine qui atteint 50.4 μ M. Par contre, son analogue structural **11261** se distingue par une CL_{50} égale ou strictement supérieure à 100 μ M caractérisant un effet indubitablement moins toxique que la galantamine.

L'autre observation non moins importante qui se dégage de cette étude *in vivo* sur la famille chimique des isoindolo [2,1-a] indole est l'écart de toxicité important qu'affiche l'analogue structural **11261** par rapport au hit originel **11288**. En se référant à leur structure moléculaire, rappelons que le hit **11288** se caractérise par la présence de deux radicaux 2-(diméthylamino) éthoxy en positions 2 et 8 alors que le hit **11261** n'en dispose que d'un seul en position 2 (figure 37). Rappelons également que l'absence du radical en C8 chez le hit **11261** provoque une chute considérable de son pouvoir inhibiteur comme en témoigne la valeur de son IC₅₀ qui passe de 0.5270 µM à 0.0473 µM chez le hit **11288** (tableaux 7 et 11). En revanche, la perte de ce radical présente l'avantage de diminuer surtout sa toxicité comme l'exprime sur le tableau 19 la valeur au moins deux fois plus élevée de sa CL₅₀ (≥ 100 µM) par rapport à celle du hit **11288** qui n'atteint que 54.4 µM.

Dans le cas de la famille des bibenzofuranes qui regroupe le hit **10758** et ses trois analogues structuraux **2**, **5** et **3033**, le tableau 19 montre que seul le hit **3033** présente une CL₅₀ équivalente ou supérieure à 100 µM témoignant d'une très faible toxicité par rapport à la galantamine. Les deux hits **10758** et **5** se révèlent au contraire plus toxiques comme en atteste leurs faibles valeurs atteignant respectivement 6.88 µM et 7.28 µM. Quant au hit **2** qui affiche une CL₅₀ de 34.95 µM, se rapprochant beaucoup de celle de la galantamine, il témoigne d'un caractère légèrement plus toxique que cette dernière.

En se basant particulièrement sur la structure moléculaire du hit originel **10758**, on rappelle que ce dernier se distingue par la présence de deux groupements méthyle en 3,3' indéniablement à l'origine de sa très forte activité inhibitrice (tableau 7). La présence de ces deux groupements s'avère aussi être liée à la toxicité de ce hit comme le montre sur le tableau 19 la faible valeur de sa CL₅₀ qui ne dépasse pas 6.88 µM. L'autre exemple frappant pouvant également illustrer l'avantage mais aussi l'inconvénient de la présence de ce groupement méthyle en 3,3' est l'analogue structural **5**. Si ce dernier, à l'instar du hit **10758**, se distingue aussi, par rapport à la galantamine, par une forte activité inhibitrice (tableau 11), son effet toxique est également à souligner comme en témoigne la faible valeur de sa CL₅₀ qui n'atteint que 7.28 µM avoisinant celle du hit **10758**. En revanche, cette toxicité s'atténue considérablement avec la perte de ces méthyles en 3,3' comme dans le cas des deux analogues structuraux **2** et **3033** dont les CL₅₀ s'élèvent respectivement à 34.95 µM et à plus de 100 µM. Si la perte des deux méthyles en 3,3' apparaît indéniablement comme facteur important d'amélioration de l'effet toxique de ces deux hits, un autre facteur tout aussi important qui contribue également à l'atténuation de cet effet toxique est la position particulière qu'occupe

les radicaux [2- (diéthylamino) éthoxy] en 5,5' sur le hit **3033**. En effet, le seul changement de position de l'un de ces deux radicaux entraîne une augmentation considérable de l'effet toxique comme en témoigne la brusque variation de la CL_{50} qui passe de plus de 100 μM dans le cas du hit **3033** où ce radical existe en 5,5' à une valeur plus basse de 34.95 μM comme chez le hit **2** où ce radical occupe les positions 5,6'.

9. Evaluation du rapport CL_{50}/IC_{50}

Pour être considéré comme principe actif, une molécule doit être capable d'arriver jusqu'à sa cible et produire l'effet thérapeutique escompté avec le moindre effet toxique possible. Les six hits étudiés plus haut en dépit de leur activité inhibitrice à l'égard de l'AChE nettement plus forte que celle de la galantamine génèrent malheureusement aussi un effet toxique chez les larves d'*Artémia* qui varie d'un hit à l'autre. Il serait alors légitime de savoir si ces hits sont plus actifs que toxiques ou inversement. Pour répondre à cette question, nous avons tenté de déterminer le partage entre l'activité et la toxicité de chaque hit par simple évaluation de son rapport CL_{50}/IC_{50} (tableau 20).

Tableau 20. Evaluation du rapport CL_{50}/IC_{50} des hits **11288**, **11261**, **10758**, **5**, **3033**, **2** en comparaison avec la galantamine.

Concentration (μM)	Composés						
	11288	10758	11261	2	5	3033	Galantamine
CL_{50}	54.4 \pm 3.1	6.88 \pm 0.53	\geq 100	34.95 \pm 1.2	7.28 \pm .79	\geq 100	50.4 \pm 2.22
IC_{50}	0.0473 \pm 0.0003	0.1998 \pm 0.0147	0.5270 \pm 0.0460	0.7520 \pm 0.0090	0.4868 \pm 0.0180	0.6170 \pm 0.02010	0.7739 \pm 0.0239
CL_{50}/IC_{50}	1150	34.43	-	46.47	14.95	-	65.12

Il ressort du tableau 20 qu'en dehors des deux hits **11261** et **3033** dont le rapport CL_{50}/IC_{50} n'a pu être déterminé en raison de leur forte concentration létale qui équivaut voire dépasse 100 μM les considérant comme non toxiques, les quatre hits **11288**, **10758**, **2** et **5** sont, comme la galantamine également, plus actifs que toxiques et ce conformément aux travaux de Brezal, C.F. et *al* (2014) qui montrent qu'un composé est plus actif que toxique

lorsque la valeur de son rapport CL_{50}/IC_{50} est supérieure à 1. Remarquablement, le hit **11288** dont la valeur s'élève jusqu'à 1150 sort du lot avec un pouvoir inhibiteur nettement plus fort notamment à faibles doses mais surtout d'une très faible activité toxique même à fortes doses.

Grâce à l'évaluation de la balance toxicité/activité, nous avons pu prouver que la modification structurale des hits **11288** et **10758** peut diminuer l'effet toxique, ce qui est le cas des analogues **11261** et **3033**. Les différentes valeurs du rapport CL_{50}/IC_{50} nous ont permis d'aboutir à la sélection des hits **11288** et **10758** comme nouveaux inhibiteurs très puissants de l'AChE dont les châssis moléculaires (squelettes de base) peuvent servir comme point de départ, lors de l'optimisation, pour la conception de nouveaux candidats médicament.

Conclusion
et
Perspectives

Le présent travail avait pour but d'identifier de nouveaux et puissants inhibiteurs de l'AChE - enzyme clé impliquée dans la maladie d'Alzheimer. L'approche technique d'une telle étude a été réalisée grâce à deux méthodes complémentaires :

- L'une *in silico* consiste à identifier d'une part, par criblage virtuel couplé à l'analyse visuelle, les inhibiteurs potentiellement plus actifs sur l'AChE que la référence galantamine et d'autre part, à déterminer leurs propriétés ADMET.
- L'autre *in vitro* consiste à évaluer expérimentalement l'activité et la toxicité potentielle de ces inhibiteurs

Dans un premier temps, le criblage virtuel par Gold, Glide et Surflex suivi par l'application de la méthode vSDC puis une analyse visuelle du mode d'interaction avec le site actif de l'enzyme nous a permis de retenir seulement une dizaine de molécules parmi les 25 000 que compte la chimiothèque de Curie.

Dans un deuxième temps, en faisant appel à la méthode d'Ellman, nous avons pu déterminer expérimentalement l'activité anti-AChE de ces dix molécules par évaluation de leur concentration inhibitrice ou IC₅₀ qui s'exprimait dans le cas du criblage virtuel en termes de score, affinité, ou énergie d'interaction. Les résultats montrent que huit composés sur les dix étudiés sont très actifs sur l'AChE, notamment les deux hits **11288** et **10758** appartenant pour le premier à la famille chimique des isoindolo [2,1-a] indole et pour le second aux bibenzofuranes dont l'affinité pour l'enzyme se révèle respectivement 16 fois et 4 fois, plus élevée que la galantamine.

Dans un troisième temps, l'étude de la similarité structurale menée à partir des deux hits **11288** et **10758**, nous a conduit à quatre analogues structuraux dont l'un portant l'identifiant **11261** correspond au premier hit et les trois autres portant les identifiants **2**, **5** et **3033** correspondent au deuxième hit. L'évaluation expérimentale de leurs IC₅₀ montre qu'ils sont moins actifs que les hits originels **11288** et **10758** mais nettement plus actifs que l'inhibiteur de référence galantamine.

L'étude de la relation structure-activité menée par analyse visuelle du mode d'interaction avec le site actif de l'AChE des deux hits originels et de leurs quatre analogues structuraux nous a permis de mettre en exergue l'importance du radical (2-(diéthylamino)éthoxy) porté par le C8 dans le cas du hit **11288** et [2- (diéthylamino)éthoxy] en 5,5' et le

méthyle en 3,3' dans le cas du hit **10758** quant à la très forte affinité de ces derniers pour l'AChE. En effet, l'absence de ces radicaux chez les analogues structuraux engendre une forte chute de leur activité inhibitrice qui se traduit par la mise en place d'un nombre limité d'interactions uniquement dans le site PAS de l'enzyme contrairement aux deux hits originels **11288** et **10758** qui forment des complexes enzyme-inhibiteur plus stables en impliquant un nombre d'interactions plus élevé dans les deux sites PAS et CAS de l'AChE. Il faut cependant souligner que la forte activité de ces analogues structuraux, par rapport à la galantamine, revient au nombre d'interactions plus important qu'ils impliquent dans le site actif de l'enzyme.

L'analyse *in silico* des propriétés ADMET des six hits **11288**, **10758**, **11261**, **2**, **5** et **3033** a conduit à des résultats positifs en faveur de leur utilisation en tant qu'inhibiteurs potentiels de l'AChE sans risque majeur de biodisponibilité par voie orale ou de toxicité. Enfin, l'étude *in vivo* de leur cytotoxicité (CL₅₀) menée sur des larves d'*Artemia salina* a montré à travers notamment l'évaluation du rapport CL₅₀/IC₅₀ que les six hits sont dotés d'une activité inhibitrice plus importante que leur effet toxique.

En conclusion, la combinaison des deux études *in vitro* et *in silico* se révèle, dans la stratégie globale de développement d'une molécule à vertu thérapeutique, comme une nouvelle approche méthodologique très efficiente quant à l'identification de nouveaux et puissants inhibiteurs de l'AChE. Cependant, l'affinité élevée pour la protéine cible n'est pas une condition suffisante. Le chemin restant que devront parcourir les hits identifiés pour devenir candidats-médicaments est encore long.

Comme perspectives, il conviendrait de compléter ce travail par les tâches suivantes :

- Effectuer des tests *in vivo* sur des lignées cellulaires afin de déterminer expérimentalement les propriétés ADMET des hits identifiés.
- Optimiser par héli-synthèse, la structure des six hits actifs sur l'AChE, en *leads*, notamment ceux qui sont plus toxiques que la galantamine
- Tester expérimentalement un nombre plus important de composés issus de notre criblage virtuel en vue d'identifier de nouveaux hits aussi puissants appartenant à de nouvelles familles chimiques.
- Affiner davantage les résultats du criblage virtuel en rentabilisant la méthode vSDC qui peut utiliser jusqu'à 12 programmes de docking moléculaire.

- Utiliser d'autres chimiothèques en quête de nouveaux inhibiteurs appartenant à d'autres familles chimiques.
- Convoiter d'autres cibles thérapeutiques telles que la BChE, également impliquée dans la maladie d'Alzheimer.

Références

Bibliographiques

A

Abdolmaleki, A., Ghasemi, J.B. and Ghasemi, F. (2017), Computer Aided Drug Design for Multi-Target Drug Design: SAR /QSAR, Molecular Docking and Pharmacophore Methods, *Current Drug Targets*, **18**(5), 556-575.

Ahn, B.O., Kang, K.K., Ahn, G.J., Kwon, J.W., Kim, W.B., Kang, K.S. et al. (2003), Efficacy of DA-8159, a new PDE5 inhibitor, for inducing penile erection in rabbits with acute spinal cord injury, *International Journal of Impotence Research*, **15**, 405–441.

Agid, Y., Dubois, B., Anand, R. and Gharabawi, G. (1998), Efficacy and tolerability of rivastigmine in patients with dementia of the Alzheimer type, *Current Therapeutic Research*, **59**, 837-845.

Akik W. (2017). Etude de la perméabilité intestinale des médicaments par la reconstruction du transporteur BCRP/ABCG2 dans des protéoliposomes. Mémoire de maîtrise en pharmacie : Technologies pharmaceutiques. Montréal : Université de Montréal. Canada.

Alles, G.A. Hawes R.C. (1940), Cholinesterase in the blood of man, *Journal of Biological Chemistry*, **133**, 375-90.

Alvarez, A., Opazo, C., Alarcón, R., Garrido, J. and Inestrosa, N.C. (1997), Acetylcholinesterase promotes the aggregation of amyloid-beta-peptide fragments by forming a complex with the growing fibrils, *Journal of Molecular Biology*, **272**(3), 348-361.

Alzheimer, A. (1907), Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde, *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie*, **64**, 146-148.

Alzheimer, A. (1911), Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters, *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie*, **4**, 356-385.

Alzheimer's Disease International. (2015), *World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia An analysis of prevalence, incidence, cost and trends*. London.

Anton, C., Deng, J., Wong, Y.S., Zhang, Y., Zhang, W., Gabos, S. et al. (2017), Modeling and simulation for toxicity assessment. *Mathematical Biosciences and Engineering*, 14(3), 581-606.

Arrault, A. (2007). Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données. Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma. Thèse de doctorat d'université : *Modélisation Moléculaire et Chimoinformatique*. Orleans : Université d'Orleans. France.

Asses, Y. (2011). Conception par modélisation et criblage *in silico* d'inhibiteurs du récepteur c-Met. Thèse de doctorat d'université : Chimie Informatique et Théorique Nancy : Université Henri Poincaré. France.

Association Monégasque pour la recherche sur la maladie d'Alzheimer. (2016). *Rapport Alzheimer et méditerranée : Etat des lieux - Enjeux - Perspectives*. Mediterranean Alzheimer Alliance. Monaco. France.

Atanasova, M., Stavrakov, G., Philipova, I., Zheleva, D., Yordanov, N. and Doytchinov, I. (2015), Galantamine derivatives with indole moiety: Docking, design, synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **23**, 5382-5389.

Atiar, M.R., Bin Imran, T., Shahidul, I. (2013), Antioxidative, antimicrobial and cytotoxic effects of the phenolics of *Leea indica* leaf extract, *Saudi Journal of Biological Sciences*, **20**, 213–225

Augry, F., Darchy, A., de Rotrou, J., Guelfi, M.C. and Forette, F. (1997), Réponse à la tacrine: bilan de deux ans de prescription, *Journal de Pharmacie Clinique*, **16**: 183-188.

B

Baig, M.H., Ahmad, K., Roy, S., Ashraf, J.M., Adil, M. and Siddiqui, M.H. (2016), Computer Aided Drug Design: Success and Limitations, *Current Pharmaceutical Design*, **22**(5), 572-581.

Baldwin, J.J., Ponticello, G.S., Anderson, P.S., Christy, M.E., Murcko, M.A., Randall, W.C. et al. (1989), Thienothiopyran-2-sulfonamides: novel topically active carbonic

anhydrase inhibitors for the treatment of glaucoma, *Journal of Medicinal Chemistry*, **32**, 2510–2513.

Barak, D., Kaplan, D., Ordentlich, A., Ariel, N., Velan, B. and Shafferman, A. (2002), The aromatic "trapping" of the catalytic histidine is essential for efficient catalysis in acetylcholinesterase, *Biochemistry*, **41**(26), 8245-8252.

Barker, A., Kettle, J.G., Nowak, T. and Pease, J.E. (2013), Expanding medicinal chemistry space, *Drug Discovery Today*, **18**(5-6), 298-304.

Barner, E.L. and Gray, S.L. (1998), Donepezil Use in Alzheimer Disease, *Annals of Pharmacotherapy*, **32**, 70–77.

Bartus, R.T., Dean, R.L., Beer, B. and Lippa, A.S. (1982), The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction, *Science*, **217**, 408-414.

Beautrait, A. (2008). Développement et validation de la plateforme de criblage virtuel VSM-G et étude du domaine FAT de la kinase d'adhérence focale FAK. Thèse de doctorat d'université : Chimie Informatique et Théorique. Nancy : Université Henri Poincaré. France.

Becker, S., Thornton L. (2004), Fosamprenavir: advancing HIV protease inhibitor treatment options, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, **5**, 1995–2005.

Benchekroun, M. (2014). Synthèse multicomposants et évaluation pharmacologique de nouveaux adduits de Ugi et de Passerini pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. Thèse de doctorat d'université : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ. Besançon : Université de Franche-Comté. France.

Bernstein, F.C., Koetzle, T.F., Williams, G.J., Meyer, Jr. E.F., Brice, M.D., Rodgers, J.R. et al. (1977), The protein data bank: A computer-based archival file for macromolecular structures, *Journal of Molecular Biology*, **112**, 535-542.

Bolton, E. *PubChem: Integrated Platform of Small Molecules and Biological Activities*. (2008). Annual Reports in Computational Chemistry.

Brezal, C.F and Barrio A.G. (2014), Actividad tripanocida de nuevos quelantes heterocíclicos, *Recursos Educativos*, **6** (1), 109-114.

Bullock, R. (2006), Efficacy and safety of memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease: the evidence to date, *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, **20**, 23-29.

C

Carr, P. D. and Ollis, D.L. (2009), Alpha/beta hydrolase fold: an update, *Protein & Peptide Letters*, **16**(10), 1137-1148.

Chaput, L. and Mouawad, L. Efficient conformational sampling and weak scoring in docking programs? (2017), Strategy of the wisdom of crowds, *Journal of Cheminformatics*, **9**, 37.

Chaput, L., Martinez-Sanz, J., Saettel, N. and Mouawad, L. (2016), Benchmark of four popular virtual screening programs: construction of the active/decoy dataset remains a major determinant of measured performance, *Journal of Cheminformatics*, **8**, 56.

Chaput, L., Martinez-Sanz, J., Quiniou, E., Rigolet, P., Saettel, N. and Mouawad, L. (2016), vSDC: a method to improve early recognition in virtual screening when limited experimental resources are available, *Journal of cheminformatics*, **8**,1.

Chen, Y.C. Beware of docking!. (2015), *Trends in Pharmacological Sciences*, **36**, 78–95.

Cheung, J., Gary, E.N., Shiomi, K. and Rosenberry, T.L. (2013), Structures of human acetylcholinesterase bound to dihydrotanshinone I and territrem B show peripheral site flexibility, *ACS Medicinal Chemistry Letters*, **4**, 1091-1096.

Cheung, J., Rudolph, M.J., Burshteyn, F., Cassidy, M.S., Gary, E.N. and Love, J. (2012), Structures of Human Acetylcholinesterase in complex with Pharmacologically Important Ligands, *Journal of Medicinal Chemistry*, **55**,10282-10286.

Colletier, J.P. and Weik, M. (2007), Exploring the conformational energy landscape of acetylcholinesterase by kinetic crystallography, *Annales pharmaceutiques françaises*, **65**(2), 108-118.

Colletier, J.P., Fournier, D., Greenblatt, H.M., Stojan, J., Sussman, J.L, Zaccai, G. et al. (2006), Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase, *The EMBO Journal*, **25**(12), 2746-2756.

Corr, P.W. (2009). *The pathway from Idea to Regulatory Approval: Examples for Drug Development*. USA: National Academy Press.

Chouraki, V. (2013). Etudes d'association pangénomiques appliquées à la recherche de nouveaux facteurs de risque génétique de la maladie d'Alzheimer. Thèse de doctorat d'université : Epidémiologie, économie de la santé et prévention. Lille : Université de Lille 2. France.

Crismon, M.L. (1994), Tacrine: First Drug Approved for Alzheimer's Disease, *Annals of Pharmacotherapy*, **28** (6), 744-751.

Cummings, J.L. and Kaufer, D. (1996), Neuropsychiatric aspects of Alzheimer's disease : The cholinergic hypothesis revisited, *Neurology*, **47**, 876-883.

D

Daina, A., Michielin, O. and Zoete, V. (2017), SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, druglikeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules, *Scientific Reports*, **7**, 42717.

Daina A. and Zoete V. (2016), A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules, *Chemmedchem*, **11**(11), 1117-1121.

Darvesh, S., Hopkins, D.A. and Geula, C. (2003), Neurobiology of Butyrylcholinesterase, *Nature Reviews Neuroscience*, **4**, 131–138.

Darvesh, S., Grantham, D.L. and Hopkins, D.A. (1998), Distribution of Butyrylcholinesterase in the Human Amygdala and Hippocampal Formation, *Journal of Comparative Neurology*, **393**, 374–390.

Das, K., Clark, A.D. Jr., Lewi, P.J., Heeres, J., De Jonge, M.R., Koymans, L.M. et al. (2004), Roles of conformational and positional adaptability in structure-based design of TMC125-R165335 (etravirine) and related non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors that are highly potent and effective against wild-type and drugresistant HIV-1 varia, *Journal of Medicinal Chemistry*, **47**, 2550–2560.

- Daviss, K.L. and Powchick, P. (1995), Tacrine, *The Lancet*, **345**, 625–630.
- Delacourte, A., Flament, S., Dibe, E. M., Hublau, P., Sablonnière, B. and Hemon, B. (1990), Pathological proteins Tau 64 and 69 are specifically expressed in the somatodendritic domain of the degenerating cortical neurons during Alzheimer's disease. Demonstration with a panel of antibodies against Tau proteins, *Acta Neuropathologica*, **80**, 111-117.
- Delogu, G. L., Matos, M.J., Fanti, M., Era, B., Medda, R., Pieroni, E. et al. (2016), 2-Phenylbenzofuran derivatives as butyrylcholinesterase inhibitors: Synthesis, biological activity and molecular modeling, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **26**(9), 2308-2313.
- Di Giovanni, C., Ettari, R., Sarno, S., Rotondo, A., Bitto, A., Squadrito, F et al. (2016), Identification of noncovalent proteasome inhibitors with high selectivity for chymotrypsin-like activity by a multistep structure-based virtual screening, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **121**, 578-591.
- Di Giovannia, S., Borlozb, A., Urbain, A., Marstonb, K A. Hostettmannb, P.A. Carrupta, M. et al. (2008), *In vitro* screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: Thin layer chromatography versus microplate methods, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **33**, 109-119.
- Dorsey, B.D., Levin, R.B., McDaniel, S.L., Vacca, J.P., Guare, J.P., Darke, P.L. et al. (1994), L-735,524: The Design of a Potent and Orally Bioavailable HIV Protease Inhibitor, *Journal of Medicinal Chemistry*, **37**, 3443–3451.
- Duan, J., Dixon, S.L., Lowrie, J.F. and Sherman, W. (2010), Analysis and comparison of 2D fingerprints: insights into database screening performance using eight fingerprint methods, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **29**, 157-170.
- Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T.L. and Sussman, J.L. (2010), Acetylcholinesterase: From 3D structure to function, *Chemico-biological Interactions*, **187**, 10-22.

E

Elkaïm, J. (2011). *Drug design in silico*. Criblage virtuel de protéines à visée thérapeutique. Thèse de doctorat d'université : Chimie-Physique. Bordeaux : Université de Bordeaux 1. France.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, Jr.V. and Featherstone, R.M. (1961), A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemical Pharmacology*, **7**: 88-90.

Empereur-Mot, C. (2017). Développement d'outils statistiques d'évaluation de méthodes de criblage virtuel : courbes de prédictivité Screening Explorer. Thèse de doctorat d'université : Bioinformatique. Paris : Conservatoire national des arts et métiers. France.

Ensign, L. M., Cone, R. and Hanes, J. (2012), Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **64**(6), 557–570.

Eystache, F., Chételat, G., Desgranges, B. and Sayette, V. (2015), *Alzheimer : fatalité ou espoir ?*. 1^{ère} ED. France : Le Muscadier.

F

Fagerberg, L., Hallström, B.M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J. et al. (2014), Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics, *Molecular & Cellular Proteomics*, **13**(2), 397-406.

Ferreira, L.L.G. and Andricopulo, A.D. (2019), ADMET modeling approaches in drug discovery, *Drug Discovery Today*, **24**(5), 1157-1165.

Fondation pour la Recherche sur Alzheimer, (2019), « Causes et facteurs de risques de la maladie d'Alzheimer », disponible sur : www.emeraldgrouppublishing.com/portal/fr/authors/harvard/2.htm (consulté le 03-03-2019).

Franklin, M.F., Rudolph, M.J., Ginter, C., Cassidy, M.S. and Cheung, J. (2016), Structures of paraoxon-inhibited human acetylcholinesterase reveal perturbations of the acyl loop and the dimer interface, *Proteins*, **84**, 1246-1256.

Fuxreiter, M. and Warshel A. (1998), Origin of the Catalytic Power of Acetylcholinesterase: Computer Simulation Studies. *Journal of the American Chemical Society*, **120**(1), 183-194.

G

Gabb, J., Jackson, R.M. and Sternberg, M.J.E. (1997), Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information, *Journal of Molecular Biology*, **272**, 106-120.

Galisteo, M., Rissel, M., Sergent, O., Chevanne, M., Cillard, J., Guillouzo, A. et al. (2000), Hepatotoxicity of tacrine: occurrence of membrane fluidity alterations without involvement of lipid peroxidation, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **294**, 160–167.

Gatz, M., Reynolds, C.A., Fratiglioni, L., Johansson, B., Mortimer, J.A., Berg, S. et al. (2006), Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry*, **63**(2), 168–174.

Gaulton, A., Bellis, L.J., Bento, A.P., Chambers, J., Davies, M., Hersey, A. et al. (2012), ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery, *Nucleic Acids Research*, **40**, 1100-1107.

Gerlits, O., Ho, K.Y., Cheng, X., Blumenthal, D., Taylor, P., Kovalevsky, A. et al. (2019), A new crystal form of human acetylcholinesterase for exploratory room-temperature crystallography studies, *Chemico-biological Interactions*, **309**, 108698-108698.

Ghenthio, L. (2010). Simulation numérique et approche orientée connaissance pour la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques. Thèse de doctorat d'université : Chimie Informatique et Théorique. Nancy : Université Henri Poincaré. France.

Ghosh, A.K., Dawson, Z.L. and Mitsuya, H. (2007), Darunavir, a conceptually new HIV-1 protease inhibitor for the treatment of drug-resistant HIV, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **15**, 7576–7580.

Girard, E., Bernard, V., Minic, J., Chatonnet, A., Krejci, E. and Molgó, J. (2007), Butyrylcholinesterase and the control of synaptic responses in acetylcholinesterase knockout mice, *Life Sciences*, **80**(24-25), 2380-2385.

Godefroy, B.M. (2017). Evaluation de l'impact des formulations pharmaceutiques sur l'absorption intestinale des molécules actives au moyen des Chambres d'Ussing. Thèse de doctorat d'université : innovation thérapeutique. Paris : Université Paris-Sud. France.

Grossberg, G.T. (2003), Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: getting on and staying on, *Current Therapeutic Research*, **64**: 216-235.

Guillaumel, J., Léonce, S., Pierre, A., Renard, P., Pfeiffer, B., Peruchon, L. et al. (2003), Synthesis and Antiproliferative Activity of Basic Ethers of 1,2-Dihydropyrrolo[1,2-a]indole, 6H-Isindolo[2,1-a]indole, and 6H-Benz[5,6]isindolo[2,1-a]indole, *Oncology Research*, **13**,537-549.

Guillaumel, J. and Royer, R. (1986), Synthèse d'éthers diéthylamino éthyliques de bibenzofurannes et de bis-benzofuryl cétones, comme analogues pharmacochimiques de la Tilorone, *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **23**,1277-1282.

Gustafsson, D., Bylund, R., Antonsson, T., Nilsson, I., Nyström, J.E. and Eriksson, U et al. (2004), A new oral anticoagulant: the 50- year challenge, *Nature Reviews Drug Discovery*, **3**(8), 649-659.

H

Haga, J.H., Ichikawa, K. and Date, S. (2016), Virtual Screening Techniques and Current Computational Infrastructures, *Current Pharmaceutical Design*, **22**(23), 3576-3584.

Halgren, T.A., Murphy, R.B., Friesner, R.A., Beard, H.S., Frye, L.L., Pollard, W.T. et al. (2004), Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring.2. Enrichment Factors in Database Screening, *Journal of Medicinal Chemistry*, **47**, 1750-1759.

Harel, M., Quinn, D.M., Nair, H.K., Silman, I. and Sussman, J.L. (1996), The X-ray Structure of a transition state analog complex reveals the molecular origins of the catalytic power and

substrate specificity of acetylcholinesterase, *Journal of the American Chemical Society*, **118**, 2340-2346.

Harvey, A.L. (1995), The Pharmacology of Galanthamine and Its Analogues, *Pharmacology & Therapeutics*, **68**, 113–128.

Hawkins, P.C.D., Warren, G.L., Skillman, A.G. and Nicholls, A. (2008), How to do an evaluation: pitfalls and traps, *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **22**, 179–190.

Hazan, C. (2008). Recherche d'inhibiteurs de haute affinité de l'ADN polymérase beta par criblage virtuel et RMN. Thèse de doctorat d'université : Biologie structurale. Toulouse : Université Toulouse III - Paul Sabatier. France.

Hennequin, L.F., Thomas, A.P., Johnstone, C., Stokes, E.S., Plé, P.A., Lohmann, J.J. et al. (1999), Design and Structure-Activity Relationship of a New Class of Potent VEGF Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors, *Journal of Medicinal Chemistry*, **42**, 5369–5389.

Herbst, R.S., Fukuoka, M. and Baselga, J. (2004), Gefitinib--a novel targeted approach to treating cancer, *Nature Reviews Cancer*, **4**(12), 956-965.

Høgh, P. (2017), Alzheimer's disease, *Ugeskrift for Laeger*, **179**(12), 686.

Horvath, D. (1997), A virtual screening approach applied to the search for trypanothione reductase inhibitors, *Journal of Medicinal Chemistry*, **40**(15), 2412-2423.

Huang, S., Grinter, S.Z. and Zou, X. (2010), Scoring functions and their evaluation methods for protein-ligand docking: recent advances and future directions, *Physical Chemistry Chemical Physics*, **12**, 12899-12908.

Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K. (1996), VMD-visual molecular dynamics, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **14**, 33-38.

I

Inestrosa, N.C., Alvarez, A., Pérez, C.A., Moreno, R.D., Vicente, M., Linker, C. et al. (1996), Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme, *Neuron*, **16**(4), 881-891.

Irwin, J.J. and Shoichet, B.K. (2005), ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening, *Journal of Chemical Information and Modeling*, **45**(1), 177-182.

J

Jain, A.N. (2003), Surflex: fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine, *Journal of Medicinal Chemistry*, **46**, 499-511.

Jasiecki, J., Żuk, M., Krawczyńska, N., Jońca, J., Szczoczarz, A., Lewandowski, K. et al. (2019), Haplotypes of butyrylcholinesterase K-variant and their influence on the enzyme activity, *Chemico-biological Interactions*, **307**, 154-157.

Jellinger, K.A. (2006), Alzheimer 100 Highlights in the History of Alzheimer Research, *Journal of Neural Transmission*, **113**, 1603–1623.

Jing, Y., Easter, A., Peters, D., Kim, N. and Enyedy, I.J. (2015), “In silico prediction of hERG inhibition,” *Future Medicinal Chemistry*, **7**, (5), 571–586.

Johnson, G. and Moore, S.W. (2006), The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design, *Current Pharmaceutical Design*, **12**(2), 217-25.

Jones, G., Willett, P. and Glen, R.C. (1995), Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation, *Journal of Molecular Biology*, **245**, 43-53.

K

Kaldor, S.W., Kalish, V.J., Davies, J.F., Shetty, B.V., Fritz, J.E., Appelt, K. et al. (1997), Viracept (Nelfinavir Mesylate, AG1343): A Potent, Orally Bioavailable Inhibitor of HIV-1 Protease, *Journal of Medicinal Chemistry*, **40**, 3979–3985.

- Kelly, W.K., O'Connor, O.A., Krug, L.M., Chiao, J.H., Heaney, M., Curley, T. et al. (2005), Phase I study of an oral histone deacetylase inhibitor, suberoylanilidehydroxamic acid, in patients with advanced cancer, *Journal of Clinical Oncology*, **23**, 3923–3931.
- Kempf, D.J., Sham, H.L., Marsh, K.C., Flentge, C.A., Betebenner, D., Green, B.E. et al. (1998), Discovery of Ritonavir, a Potent Inhibitor of HIV Protease with High Oral Bioavailability and Clinical Efficacy, *Journal of Medicinal Chemistry*, **41**, 602–617.
- Khunnawutmanotham, N., Chimnoi, N., Saparpakorn, P. and Techasakul, S. (2016), Synthesis and anti-acetylcholinesterase activity of scopoletin derivatives, *Bioorganic Chemistry*, **65**, 137-145.
- Kim, C.U., Lew, W., Williams, M.A., Wu, H., Zhang, L., Chen, X. et al. (1998), Structure-activity relationship studies of novel carbocyclic influenza neuraminidase inhibitors, *Journal of Medicinal Chemistry*, **41**, 2451–2460.
- Kim, E.E., Baker, C.T., Dwyer, M.D., Murcko, M.A., Rao, B.G., Tung, R.D et al. (1995), Crystal structure of HIV-1 protease in complex with VX-478, a potent and orally bioavailable inhibitor of the enzyme, *Journal of the American Chemical Society*, **117**, 1181–1182.
- Kirchmair, J., Markt, P., Distinto, S., Wolber, G. and Langer, T. (2008), Evaluation of the performance of 3D virtual screening protocols: RMSD comparisons, enrichment assessments, and decoy selection--what can we learn from earlier mistakes, *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **22**(3-4), 213-228.
- Kitchen, D.B., Decornez, H., Furr, J.R. and Bajorath, J. (2004), Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications, *Nature Reviews Drug Discovery*, **3**(11), 935-949.
- Koeppen, H., Kriegl, J., Lessel, U. et al. (2011). *Ligand-Based Virtual Screening*, in *Virtual Screening Principles, Challenges and Practical Guidelines*. Sottriffer C: Wiley-YCH.
- Koyama, T., Yamaotsu, N., Nakagome, I., Ozawa, S., Yoshida, T., Hayakawa, D. et al. (2017). Multi-step virtual screening to develop selective DYRK1A inhibitors, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **72**, 229-239

Kryger, G., Harel, M., Giles, K., Toker, L., Velan, B., Lazar, A. et al. (2000), Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculin-II, *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, **56**, 1385-1394.

Kryshtafovych, A. and Fidelis, K. (2009), Protein structure prediction and model quality assessment, *Drug Discovery Today*, **14**, 386-393.

Kutlushina, A., Khakimova, A., Madzhidov, T. and Polishchuk, P. (2018), Ligand Based Pharmacophore Modeling Using Novel 3D Pharmacophore Signatures, *Molecules*, **23**(12), 3094

Kwasnieski, O. (2010). Etude théorique de la réactivation de l'AChE inhibée par le tabun. Thèse de doctorat d'université : Chimie organique. Paris : Université Pierre et Marie Curie. France.

L

Lagarde, N. (2014). Méthodes de criblage virtuel *in silico* : importance de l'évaluation et application à la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'interleukine 6. Thèse de doctorat d'université : Bioinformatique. Paris : Conservatoire national des arts et métiers. France.

Lang, P.T., Brozell, S.R., Mukherjee, S., Pettersen, E.F., Meng, E.C., Thomas, V. et al. (2009), DOCK 6: combining techniques to model RNA-small molecule complexes, *RNA*, **15**, 1219–1230.

Lapre, E. (2010). Maladie d'Alzheimer et thérapies non médicamenteuses : évaluation de la stimulation cognitive et de l'activité physique sur le fonctionnement exécutif. Thèse de doctorat d'université : Psychologie. Bordeaux : Université de Bordeaux. France.

Lavecchia, A. and Giovanni, C.D. (2013), Virtual screening strategies in drug discovery: A critical review, *Current Medicinal Chemistry*, **20**, 2839–2860.

Leach, A.R., Shoichet, B.K. and Peishoff, C.E. (2006), Prediction of protein-ligand interactions. Docking and scoring: successes and gaps, *Journal of Medicinal Chemistry*, **49**(20), 5851-5856.

Leeson, P.D. and Springthorpe, B. (2007), The influence of drug-like concepts on decisionmaking in medicinal chemistry, *Nature Reviews Drug Discovery*, **6**, 881-890.

Lejus, C., Blank, Y., Burnat, P. and Souron, R. (1998), Les cholinestérases, *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, **17**, 1122-1135.

Li, B., Sedlacek, M., Manoharan, I., Boopathy, R., Duysen, E.G., Masson, P. et al. (2005), Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma, *Biochemical Pharmacology*, **70**(11), 1673-1684.

Li, B., Stribley, J.A., Ticu, A., Xie, W., Schopfer, L.M., Hammond, P. et al. (2000), Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse, *Journal of Neurochemistry*, **75**(3), 1320-1331.

Li, R.S., Wang, X.B., Hu, X.J., Kong, L.Y., (2013), Design, synthesis and evaluation of flavonoid derivatives as potential multifunctional acetylcholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **23**, 2636-2641

Lindsay, M.A. (2005), Finding new drug targets in the 21st century, *Drug Discovery Today*, **10**, 1683-1690.

Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W. and Feeney, P.J. (1997), Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **23**, 3-25.

Lipton, S.A. (2005), The molecular basis of memantine action in Alzheimer's disease and other neurologic disorders: Low-affinity, uncompetitive antagonism, *Current Alzheimer Research*, **2**, 155-165.

Liu, M., Lo, C.Y., Wang, G., Chow, H.F., Ngo, J.C.K., Wan, D.C.C et al. (2017), Identification of influenza polymerase inhibitors targeting polymerase PB2 cap-binding domain through virtual screening, *Antiviral Research*, **144**, 186-195.

Lombardo, L.J., Lee, F.Y., Chen, P., Norris, D., Barrish, J.C., Behnia, K. et al. (2004), Discovery of N-(2-Chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a Dual Src/Abl Kinase

Inhibitor with Potent Antitumor Activity in Preclinical Assays, *Journal of Medicinal Chemistry*, **47**, 6658–6661.

Lynch, T.J., Mattes, C.E., Singh, A., Bradley, R.M., Brady, R.O. and Dretchen, K.L. (1997), Cocaine detoxification by human plasma butyrylcholinesterase, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **145**(2), 363-371.

M

Maelicke, A., Samochocki, M., Jostock, R., Fehrenbacher, A., Ludwig, J., Albuquerque E.X. et al. (2001), Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease, *Biological Psychiatry*, **49**(3), 79-88.

Magis, C. (2007). Conception de Ligands Protéiques par Bioinformatique et Modélisation Moléculaire. Thèse de doctorat d'université : Ingénierie des protéines. Paris : Muséum National d'Histoire Naturelle. France.

Mason, J.W., Schmid, C.L., Bohn, L.M. and Roush, W.R. (2017), Stolonidiol: Synthesis, Target Identification, and Mechanism for Choline Acetyltransferase Activation, *Journal of the American Chemical Society*, **139**(16), 5865-5869.

Masson, P., Legrand, P., Bartels, C.F., Froment, M.T., Schopfer, L.M. and Lockridge, O. (1997), Role of aspartate 70 and tryptophan 82 in binding of succinylcholine to human butyrylcholinesterase, *Biochemistry*, **36**(8), 2266-2277.

Mehta, D., Jackson, R., Paul, G., Shi, J. and Sabbagh, M. (2017), Why do trials for Alzheimer's disease drugs keep failing? A discontinued drug perspective for 2010-2015, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, **26**(6), 735-739.

Mendel, B. and Rudney, H. (1943), Studies on cholinesterases. I. Cholinesterase and pseudocholinesterase, *Journal of Biochemistry*, **37**, 59-63.

Mendel, D.B., Laird, A.D., Xin, X., Louie, S.G., Christensen, J.G., Li, G. et al. (2003), *In vivo* antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship, *Clinical Cancer Research*, **9**, 327–337.

Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L. (1982), Brine shrimp: a convenient generalbioassay for active plant constituents. *Planta Medica*. **45**, 31–34.

Michael, J.M. and Catherine, F.M. (2007), *Complications in anesthesia*. 2^{ème} ed. USA: JOHN L ATLEE.

Mollerup, H.M. and Gätke, M.R. (2011), Butyrylcholinesterase gene mutations in patients with prolonged apnea after succinylcholine for electroconvulsive therapy, *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, **55**(1), 82-88.

Morgan, S., Grootendorst, P., Lexchin, J., Cunningham, C. and Greyson, D. (2011), The cost of drug development: A systematic review, *Health Policy (New York)*, **100**, 4–17.

Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S. et al. (2009), AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility, *Journal of Computational Chemistry*, **30**, 2785–2791.

N

Nachon, F. (2016). Apport des structures cristallographiques à la compréhension du mécanisme d'inhibition des cholinestérases par les neurotoxiques organophosphorés. Habilitation à diriger des travaux de recherches : Chimie et Sciences du Vivant. Grenoble : Université Joseph Fourier – Grenoble I. France.

Nachon, F., Nicolet, Y., Viguié, N., Masson, P., Fontecilla-Camps, J.C. and Lockridge, O. (2002), Engineering of a monomeric and low-glycosylated form of human butyrylcholinesterase: expression, purification, characterization and crystallization, *European Journal of Biochemistry*, **269**(2), 630-637.

Nichols, S.E., Baron, R., Ivetac, A. and McCammon, J.A. (2011), Predictive Power of Molecular Dynamics Receptor Structures in Virtual Screening, *Journal of Chemical Information and Modeling*, **51**, 1439–1446.

Niu, H., Álvarez-Álvarez, I., Guillén-Grima, F. and Aguinaga-Ontoso, I. (2017), Prevalence and incidence of Alzheimer's disease in Europe: A meta-analysis, *Neurología*, **32**(8), 523-532.

Njoroge, F.G., Chen, K.X., Shih, N.Y. and Piwinski, J.J. (2008), Challenges in modern drug discovery: a case study of boceprevir, an HCV protease inhibitor for the treatment of hepatitis C virus infection, *Accounts of Chemical Research*, **41**(1), 50-59.

O

Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M. et al. (1992), The alpha/beta hydrolase fold, *Protein Engineering*, **5**, 197-211.

Ordentlich, A., Barak, D., Sod-Moriah, G., Kaplan, D., Mizrahi, D., Segall, Y. et al. (2004), Stereoselectivity toward VX is determined by interactions with residues of the acyl pocket as well as of the peripheral anionic site of AChE, *Biochemistry*, **43**(35), 11255-11265.

Ottaviani, G., Gosling, D.J., Patissier, C., Rodde, S., Zhou, L. and Faller, B. (2010), What is modulating solubility in simulated intestinal fluids?, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **41**(3-4), 452-457.

Oukoloff, K., Coquelle, N., Bartolini, M. and Naldi, M., Le Guevel R et al. (2019), Design, biological evaluation and X-ray crystallography of nanomolar multifunctional ligands targeting simultaneously acetylcholinesterase and glycogen synthase kinase-3, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **168**, 58-77.

P

Paquet, E. and Viktor, H.L. (2015), Molecular dynamics, monte carlo simulations, and langevin dynamics: a computational review, *BioMed Research International*, 183918-18.

Parsons, C.G., Stöffler, A. and Danysz, W. (2007), Memantine: A NMDA Receptor Antagonist That Improves Memory by Restoration of Homeostasis in the Glutamatergic

System-- Too Little Activation Is Bad, Too Much Is Even Worse, *Neuropharmacology*, **53**, 699–72.

Patry-Morel, C. (2006), *Maladie d'Alzheimer et troubles apparentés : rééducation, théorie et pratique*, France : Solal.

Paul, S.M., Mytelka, D.S., Dunwiddie, C.T., Persinger, C.C., Munos, B.H., Lindborg, S.R. et al. (2010), How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge, *Nature Reviews Drug Discovery*, **9**, 203-214.

Perry, E.K., Gibson, P.H. and Blessed, G. (1977), Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue, *Journal of the Neurological Sciences*, **34**, 247-265.

Petito, E.S., Foster, D.J.R., Ward, M.B. and Sykes, M.J. (2018), Molecular Modeling Approaches for the Prediction of Selected Pharmacokinetic Properties, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **18**(26), 2230-2238.

Pihan, E. (2013). Recherche de nouveaux antipaludiques par bioinformatique structurale et chémoinformatique. Application à deux cibles : *PfAMA1* et *PfCCT*. Thèse de doctorat d'université : Interactions moléculaires et cellulaires. Nice : Université de Nice-Sophia Antipolis. France.

Polinsky, R. J. (1998), Clinical pharmacology of rivastigmine: a new-generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease, *Clinical Therapeutics*. 1998, **20**(4), 634-647.

Pollack, V.A., Savage, D.M., Baker, D.A., Tsaparikos, K.E., Sloan, D.E., Moyer, J.D. et al. (1999), Inhibition of epidermal growth factor receptor-associated tyrosine phosphorylation in human carcinomas with CP-358,774: dynamics of receptor inhibition in situ and antitumor effects in athymic mice, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **291**, 739–748.

Pope, C.N. and Brimijoin, S. (2018), Cholinesterases and the fine line between poison and remedy, *Biochemical Pharmacology*, **153**, 205-216.

R

Rahuel, J., Rasetti, V., Maibaum, J., Rüeger, H., Göschke, R., Cohen, N.C. et al. (2000), Structure-based drug design: the discovery of novel nonpeptide orally active inhibitors of human rennin, *Chemistry and Biology*, **7**, 493–504.

Rainer, B., Pinter, E., Czerny, T., Riegel, E., Kirchnawy, C., Marin-Kuan, M. et al. (2018), Suitability of the Ames test to characterise genotoxicity of food contact material migrants,” *Food Additives & Contaminants: Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, **10**, 1–14.

Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T. and Klebe, G. (1996), A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm, *Journal of Molecular Biology*, **261**, 470-489.

Raunio, H., Kuusisto, M., Juvonen, R.O. and Pentikäinen, O.T. (2015), Modeling of interactions between xenobiotics and cytochrome P450 (CYP) enzymes, *Frontiers in Pharmacology*, **6**,123.

Rayar, A.M. (2017). *In silico drug design et chimie médicinale : développement de nouvelles molécules coumariniques, sélectives de la cyclooxygénase-2*. Thèse de doctorat d’université : Bioinformatique. Paris : Conservatoire National des Arts et Métiers. France.

Recanatini, M. and Valenti, P. (2004), Acetylcholinesterase inhibitors as a starting point towards improved Alzheimer's disease therapeutics, *Current Pharmaceutical Design*, **10**, 3157- 3166.

Rinne, J O., Sako, E., Paljarvi, L., Molsa, P.K. and Rinne, U.K. (1988), A comparison of brain choline acetyltransferase activity in Alzheimer's disease, multi-infarct dementia, and combined dementia, *Journal of Neural Transmission*, **73**, 121-128.

Roberts, N.A., Martin, J.A., Kinchington, D., Broadhurst, A.V., Craig, J.C., Duncan, I.B. et al. (1990), Rational design of peptide-based HIV proteinase inhibitors, *Science*, **248**, 358-361.

Robinson, B.S., Riccardi, K.A., Gong, Y.F., Guo, Q., Stock, D.A., Blair, W.S. et al. (2000), BMS-232632, a highly potent human immunodeficiency virus protease inhibitor that can be

used in combination with other available antiretroviral agents, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**, 2093–2099.

Roehrig, S., Straub, A., Pohlmann, J., Lampe, T., Pernerstorfer, J., Schlemmer, K.H. et al. (2005), Discovery of the novel antithrombotic agent 5-chloro-N-((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl)methylthiophene-2-carboxamide (BAY 59-7939): an oral, direct factor Xa inhibitor, *Journal of Medicinal Chemistry*, **48**, 5900–5908.

Rogers, S.L. and Friedhoff, L.T. (1997), Donepezil provides long-term clinical benefits for patients with Alzheimer's Disease (AD), *Journal of the Neurological Sciences*, 1997, **150**, 296.

Rossor, M.N., Garrett, N.J., Johnson, A.L., Mountjoy, C.Q., Roth, M. and Iversen, L. L. (1982), A post-mortem study of the cholinergic and GABA systems in senile dementia, *Brain*, **105**, 313-330.

Rusnak, D.W., Lackey, K., Affleck, K., Wood, E.R., Alligood, K.J., Rhodes, N. et al. (2001), The effects of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW2016, on the growth of human normal and tumor-derived cell lines in vitro and in vivo, *Molecular Cancer Therapeutics*, **1**, 85–94.

S

Sanson, B. (2009). Dynamique structurale de l'acétylcholinestérase étudiée par cristallographie aux rayons X et par une méthode spectroscopique complémentaire. Thèse de doctorat d'université : Physique pour les sciences du vivant. Grenoble: Université Joseph Fourier – Grenoble I. France.

Savjani, K.T., Gajjar, A.K. and Savjani, J.K. (2012), Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques, *ISRN Pharmaceutics*, **2012**:195727.

Schneider, G. and Fechner, U. (2005), Computer-based de novo design of drug-like molecules, *Nature Reviews Drug Discovery*, **4**(8), 649-663.

- Sham, H.L., Kempf, D.J., Molla, A., Marsh, K.C., Kumar, G.N., Chen, C.M. et al. (1998), ABT-378, a highly potent inhibitor of the human immunodeficiency virus protease, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42**, 3218–3224.
- Silver, L. H. (2000), Dose-response evaluation of the ocular hypotensive effect of brinzolamide ophthalmic suspension (Azopt). Brinzolamide Dose-Response Study Group, *Survey of Ophthalmology*, **44** (2), 147-153.
- Singh, R. and Sadiq, N.M. (2019), *Cholinesterase Inhibitors*, USA: StatPearls Publishing.
- Sleijfer, S., Ray-Coquard, I., Papai, Z., Le Cesne, A., Scurr, M., Schöffski, P. et al. (2009), Pazopanib, a multikinase angiogenesis inhibitor, in patients with relapsed or refractory advanced soft tissue sarcoma: a phase II study from the European organisation for research and treatment of cancer-soft tissue and bone sarcoma group (EORTC study 620), *Journal of Clinical Oncology*, **27**, 3126–3132.
- Sorbera, L.A., Bozzo, J. and Castaner, J. (2005), Dabigatran/Dabigatran etexilate: Prevention of DVT prevention of ischemic stroke thrombin inhibitor, *Drugs Future*, **30**, 877–885.
- Spencer, C.M. and Noble S. (1998), Rivastigmine: a review of its use in Alzheimer's disease, *Drugs & Aging*, **13**, 391-411.
- Stedman, E., Stedman, E.D., Easson, E. and Easson, L.H. (1932), Cholinesterase. An enzyme in the blood serum of the horse, *Journal of Biochemistry*, **26** , 2056-2066.
- Stroppolo, M.E., Falconi, M., Caccuri, A.M. and Desideri, A. (2001), Superefficient enzymes, *Cellular and Molecular Life Sciences*, **58**, 1451-1460.
- Summers, W.K., Majovski, L.V., Marsh, G.M., Tachiki, K. and Kling, A. (1986), Oral tetrahydroaminoacridine in long-term-treatment of senile dementia, Alzheimer type, *The New England Journal of Medicine*, **315**(20), 1241-1246.
- Sussman, J.L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L. et al. (1991), Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein, *Science*, **253**(5022), 872-881.

T

Tanimoto, T.T. (1958). *An elementary mathematical theory of classification and prediction*. International Business Machines Corporation.

Tanrikulu, Y., Kruger, B. and Proschak, E. (2013), The holistic integration of virtual screening in drug discovery, *Drug Discovery Today*, **18**(7-8), 358-364.

Thapa, S., Lv, M. and Xu, H. (2017), Acetylcholinesterase: A Primary Target for Drugs and Insecticides, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **17**(17), 1665-1676.

Tuccinardi, T. (2009), Docking-based virtual screening: Recent developments, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, **12**, 303–314.

Turner, S.R., Strohbach, J.W., Tommasi, R.A., Aristoff, P.A., Johnson, P.D., Skulnick, H.I. et al. (1998), Tipranavir (PNU-140690): A Potent, Orally Bioavailable Nonpeptidic HIV Protease Inhibitor of the 5,6-Dihydro-4-hydroxy-2-pyrone Sulfonamide Class, *Journal of Medicinal Chemistry*, **41**, 3467–3476.

U

Urbain, A. (2007). Isolement de xanthones et coumarines inhibitrices de l'acétylcholinestérase, respectivement à partir de "*Gentianella campestris*" (L.) Börner et "*Gentianella amarella*" (L.) Börner ssp. "*acuta*" (Michx.) J.M. Gillett (Gentianaceae), et "*Peucedanum ostruthium*" (L.) Koch (Apiaceae). Thèse de doctorat d'université : Sciences Pharmaceutiques. Genève : Université de Genève. Suisse.

V

Vagedes, P., Rabenstein, B., Aqvist, J., Marelus, J. and Knapp, E.W. (2000), The Deacylation Step of acetylcholinesterase: Computer Simulation Studies, *Journal of the American Chemical Society*, **122** (49), 12254-12262.

Van de Waterbeemd, H. and Gifford, E. (2003), ADMET *in silico* modelling: towards prediction paradise ?, *Nature Reviews Drug Discovery*, **2**(3), 192–204.

Von Gunten, A. and K ung A. (2000), Les limites de la prescription des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase dans la maladie d'Alzheimer, *Revue médicale suisse*, **4** : 203-213.

Veber, D.F., Johnson, S.R., Cheng, H.Y., Smith, B.R., Ward, K.W. and Kopple, K.D. (2002), Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates, *Journal of Medicinal Chemistry*, **45**(12), 2615-2623.

Vistoli, G., Pedretti, A. and Testa, B. (2008), Assessing drug-likeness – what are we missing?, *Drug Discovery Today*, **13**, 285-294.

von Itzstein, M., Wu, W.Y., Kok, G.B., Pegg, M.S., Dyason, J.C., Jin, B. et al. (1993), Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication, *Nature*, **363**, 418–423.

Von Tungeln, L.S., Walker, N.J., Olson, G.R., Mendoza, M.C., Felton, R.P., Thorn, B.T. et al. (2017), Low dose assessment of the carcinogenicity of furan in male F344/N Nctr rats in a 2-year gavage study, *Food and Chemical Toxicology*, **99**,170-181.

W

Wandhammer, M. (2012). Etude structurale de l'inhibition des cholinestérases par les neurotoxiques organophosphor s : stratégie de r activation. Thèse de doctorat d'université : Chimie biologique et thérapeutique. Strasbourg : Université de Strasbourg. France.

Wang, D. and Bakhai, A. (2006). *Clinical Trials: A Practical Guide to Design, Analysis, and Reporting*. England: Remedica Medical Education and Publishing.

Weisberg, E., Manley, P.W., Breitenstein, W., Br uggen, J., Cowan-Jacob, S.W., Ray, A. et al. (2005), Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl, *Cancer Cell*, **7**, 129–141.

Wilhelm, S.M., Carter, C., Tang, L., Wilkie, D., McNabola, A., Rong, H. et al. (2004), BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and

targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis, *Cancer Research*, **64**, 7099–7109.

Wohlfart, S., Gelperina, S. and Kreuter, J. (2012), Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles, *Journal of Controlled Release*, **161**(2), 264–273.

X

Xue, L., Ko, M.C., Tong, M., Yang, W., Hou, S., Fang, L. et al. (2011), Design, preparation, and characterization of high-activity mutants of human butyrylcholinesterase specific for detoxification of cocaine, *Molecular Pharmacology*, **79**(2), 290-297.

Y

Yang, Y., Adelstein, S.J. and Kassis, A.I. (2012), Target discovery from data mining approaches, *Drug Discovery Today*, **17**, 16–23.

Yu, W. and MacKerell, A.D.Jr. (2017), Computer-Aided Drug Design Methods, *Methods in Molecular Biology*, **1520**, 85-106.

Z

Zhou, J., Li, Q., Wu, M., Chen, C. and Cen, S. (2016), Progress in the Rational Design for Polypharmacology Drug, *Current Pharmaceutical Design*, **22**(21), 3182-3189.

Zimmermann, J., Buchdunger, E., Mett, H., Meyer, T. and Lydon, N.B. (1997), Potent and selective inhibitors of the Abl-kinase: phenylamino-pyrimidine (PAP) derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **7**, 187–192.

Travaux scientifiques

Publications

El Hassen MOKRANI, Abderrahmane BENSEGUENI, Ludovic CHAPUT, Claire BEAUVINEAU, Hanane DJEGHIM, Liliane MOUAWAD. Identification of New Potent Acetylcholinesterase Inhibitors Using Virtual Screening and In Vitro Approaches. *Molecular informatics*. 2019 ;38 : 1800118

Imen Boualia., Chamseddine Derabli., Raouf Boulcina., Chawki Bensouici., Muhammet Yildirim., Arzu Birinci Yildirim., **El Hassen Mokrani**., Abdelmadjid Debache. Synthesis, molecular docking studies, and biological evaluation of novel alkyl bis(4-amino-5-cyanopyrimidine) derivatives. *Archiv der Pharmazie*. 2019;e1900027

Rym Gouta Demmak., Simon Bordage., Abderrahmane Bensegueni., Naima Boutaghane., Thierry Hennebelle., **El Hassen Mokrani**., Sevser Sahpaz. Chemical Constituents from *Solenostemma argel* and their Cholinesterase Inhibitory Activity. *Natural Product Sciences*. 2019 ; 25(2) : 115-121.

Communications

MOKRANI El Hassen, BENSEGUENI Abderrahmane, TENIOU Soumia, BENSOUICI Chawki. Identification de nouveaux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase en combinant le criblage virtuel *in silico* et les tests biologiques *in vitro*. The international Bioinformatics Day. Boumerdès. 5 Novembre 2019.

El Hassen MOKRANI, Abderahmane BENSEGUENI, Soumia TENIOU, Chawki BENSOUICI. Conception de nouveaux inhibiteurs de l'Acétylcholinestérase par criblage virtuel et analyses biologiques. Premier séminaire national sur les molécules bioactives. Oum El Bouaghi. 18, 19 novembre 2019.

MOKRANI El Hassen, BENSEGUENI Abderrahmane, TENIOU Soumia, BENSOUICI Chawki. Mise en évidence de nouveaux inhibiteurs de l'Acétylcholinestérase pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. 3ème congrès national de biochimie et de génétique médicale. Constantine, 2018.

MOKRANI El Hassen, BENSEGUENI Abderrahmane, TENIOU Soumia, BENSOUICI Chawki. Criblage virtuel : une nouvelle approche pour la conception de nouveaux

médicaments anti-Alzheimer. 7ème congrès national de biologie médicale et de médecine de laboratoire. Alger, 2018.

Publication

DOI: 10.1002/minf.201800118

Identification of New Potent Acetylcholinesterase Inhibitors Using Virtual Screening and *In Vitro* Approaches

El Hassen Mokrani,^[a] Abderrahmane Bensegueni,^[a] Ludovic Chaput,^[b, c] Claire Beauvineau,^[b, d] Hanane Djeghim,^[e] and Liliane Mouawad^{*(b)}

Abstract: Acetylcholinesterase (AChE) is currently the most favorable target for the symptomatic treatment and reduction of Alzheimer's disease (AD). In order to identify new potent inhibitors of this enzyme, we describe herein a new structure-based virtual screening (SBVS) using the Institut Curie-CNRS chemical library (ICCL), which contained at the screening date 14307 compounds. The strategy undertaken in this work consisted of the use of several docking programs in SBVS calculations followed by the application

of a consensus method (vSDC) and a scrupulous visual analysis. It allowed us to obtain a high degree of success, with a yield of almost 86%, since 12 hits were identified among only 14 molecules tested *in vitro*. Still more remarkably, 6 of these hits were more active than galantamine, the reference inhibitor. These hits were predicted to have good ADMET properties. The two most promising compounds can serve as leads for AD treatment.

Keywords: Acetylcholinesterase · Alzheimer's disease · inhibitory activity · Virtual screening · vSDC

1 Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disease, accounting for approximately two thirds of all cases of dementia and affecting up to 20% of individuals older than 80 years.^[1] Different studies associate the deteriorated cognitive functions with the lowering amount of acetylcholine (ACh) in AD patients.^[2–4] ACh, released into the synapse from one neuron, binds to its receptor located on the postsynaptic membrane to transmit the signal to the next neuron. It is well known that a serine protease called acetylcholinesterase (AChE) catalyzes the degradation of the neurotransmitter ACh, leading to the termination of cholinergic neurotransmission.^[5] The activity of this enzyme increases in AD patients, making it a promising target to be inhibited for symptomatic treatment of the disease.^[6]

Until recently, four representative anti-AChE agents, tacrine, rivastigmine, donepezil and galantamine, have been approved by the Food and Drug Administration to treat the symptoms caused by cholinergic dysfunction in AD.^[7] However, recent clinical studies showed that the use of the above drugs had been limited by serious side effects such as hepatotoxic liability,^[8] diarrhea and vomiting.^[9] Therefore, it is still necessary to search for novel compounds to treat AD. Structural studies of AChE active pocket revealed a 20 Å deep gorge.^[10–11] It is composed of two adjacent ligand binding sites, the peripheral site (PAS) at the entrance of the cavity and the catalytic site (CAS) at its bottom^[11–14] (Figure 1). In the CAS, the catalytic triad residues (Ser203, His447 and Glu334) are responsible for the substrate hydrolyzation.^[12] Kinetic and thermodynamic studies have shown that inhibitors can interact with either or both CAS and PAS sites. It should be noted that the most potent AChE

- [a] E. H. Mokrani, A. Bensegueni
Laboratory of Applied Biochemistry
Department of Biochemistry and Cellular and Molecular Biology
Faculty of Natural and Life Sciences
University Mentouri Brothers Constantine 1
Algeria
- [b] L. Chaput, C. Beauvineau, L. Mouawad
Chemistry, Modeling and Imaging for Biology (CMIB)
Institut Curie, PSL Research University, CNRS UMR 9187 – INSERM U1196
Paris-Saclay University
F-91405 Orsay, France
E-mail: liliane.mouawad@curie.fr
- [c] L. Chaput
Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS UPR 2301
LabEx LERMIT
91198 Gif-sur-Yvette, France
and
Department of Nephrology and Dialysis, AP-HP
Tenon Hospital, INSERM UMR_S 1155
75020 Paris, France
- [d] C. Beauvineau
Chemical library
Institut Curie-CNRS, UMR9187-U1196 and UMR3666-U1143
F-91405 Orsay, France
- [e] H. Djeghim
Laboratory of Biochemistry
Division of Biotechnology and health
Biotechnology research Center (CRBt)
Constantine, Algeria
and
Laboratory of Genetics and Biochemistry Plant Biotechnology
Faculty of Natural and Life Sciences
University Mentouri Brothers Constantine 1
Algeria

 Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/minf.201800118>

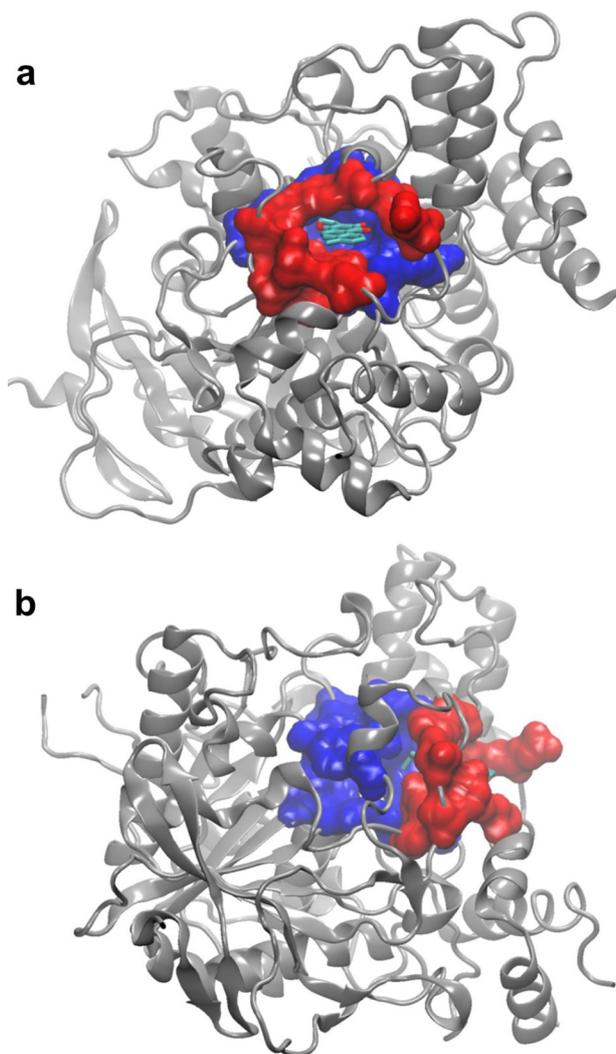


Figure 1. AChE Active site. Front view (a) and side view (b) of the X-ray structure (PDB ID: 4M0E) in the presence of the PDB ligand (dihydrotanshinone I). The entire protein is shown as gray cartoons. The surface of the CAS region is in dark blue and that of the PAS region in red. The ligand, which is located in the bottom of the active-site gorge, is shown as cyan and red tubes. The images were done with VMD.^[22]

inhibitors developed in the recent years bind simultaneously to both CAS and PAS.^[15–17]

This work aims at identifying new potent AChE inhibitors by combining structure-based virtual screening (SBVS) and *in vitro* assays. Docking studies followed by a computational ADME prediction were performed in order to elucidate the structural basis of the inhibition of AChE and to verify the pharmacokinetic properties of the most promising hits.

2 Materials and Methods

2.1 Target Preparation

The crystal structure of human AChE (EC 3.1.1.7), at 2.0 Å resolution, was downloaded from the Protein Data Bank (PDB ID: 4M0E^[18]). Only the catalytic chain A and four water molecules located in the binding site were kept. The enzyme was prepared for docking studies using Schrödinger's protein preparation wizard.^[19,20] This wizard serves to control the side chain orientation of asparagine, glutamine and histidine residues, for which there may be confusion in the PDB structure between N and O atoms for the first two or N and C atoms for the third. In addition, this wizard helps to define the protonation state of some residues and to add all hydrogen atoms.^[21] VMD, the Visual Molecular Dynamics software,^[22] was used to define the binding site of AChE by selecting all the residues with at least one heavy atom within 6 Å from the ligand of the crystal structure. This selection may be refined by adding every residue beyond 6 Å considered as essential for the continuity of the cavity.^[23] Finally, a mol2 file was exported and used as a starting structure for docking programs.

2.2 Ligand Preparation

For SBVS calculations, we used the Institut Curie-CNRS chemical library (ICCL) (<https://science.institut-curie.org/platforms/chemical-library>), which contained at the screening date 14307 compounds synthesized by the chemists of the Institut Curie resulting from different research programs of chemical optimization against various therapeutic targets. See <http://tiny.cc/o1fu5x> for the physical-chemistry properties of ICCL. We added to this library 451 known AChE inhibitors from the ChEMBL database.^[24] The resulting 14758 compounds were prepared for SBVS using the "LigPrep 2.8.0" module of the Schrödinger suite.^[19] This preparation was undertaken to generate for each molecule a number of structures (up to 32) with various enantiomers (when undefined), protonation states at $\text{pH } 7.4 \pm 1$ and tautomers.^[23] The final chemical library consisted of 25260 molecules that were used for SBVS calculations.

2.3 Structure Based Virtual Screening

SBVS was performed using four docking programs: Glide,^[25,26] GOLD,^[27] Surflex^[28] and FlexX,^[29] in which the target atoms are fixed and the ligands are flexible. These programs were used because of their variability or differences in search algorithms and scoring functions.

The first docking program (Glide version 6.3) required a gridbox at the centroid of the AChE active pocket. The default grid size was adopted from Glide in a way to fit the cavity shape. Docking calculations were done with the

default parameters with Glide Standard Precision (SP). The resulting poses were ranked according to their GlideScore, which were given as a binding free energy, ΔG (kcal/mol). The second software (GOLD version 5.2.2) is based on the genetic algorithm, whose parameters were set to "GOLD Default". The Goldscore scoring function was selected for sorting the compounds. The third program (Surflex version 2.745) was based on an incremental construction search approach. This program created an ideal active site ligand called "protomol", which consisted of a set of hydrophobic and hydrophilic probes (CH_4 , NH and CO) that completely fit the cavity surface, making all possible interactions with the binding site residues. The creation of the protomol was based on the binding site residue list previously defined in addition to two parameters, the "threshold" and the "bloat" with their default values. The docking mode "GeomX" was employed and the Surflex scoring function, given as a pK_d , was used for the ranking of the molecules.^[30] The last program (FlexX version 2.1.5) was also based on an incremental construction of ligands. The selection of the base fragments was set to automatic mode and the fragment placement used the standard algorithm. A local optimization of 1000 steps with an expanded radius of 3 Å was performed for all poses. FlexX scoring function, which gave scores as ΔG in kJ/mol, was used for molecule ranking.^[23] Each program was requested to retain 10 poses per tautomer, except Surflex, which provided 20 poses, although the ranking of a molecule was solely based on its top-ranked pose.

2.4 The Variable Standard Deviation Consensus Method

In SBVS studies, the use of several programs, followed by a consensus method, minimizes the number of top-ranked false positive molecules, because, with their various scoring functions and positioning algorithms, programs have little chance to commit the same mistakes. The variable Standard Deviation Consensus method (vSDC)^[23] is a consensus method that consists of the intersection of sets of results from several SBVS methods on the basis of a variable standard deviation (SD) of the molecule ranking. This SD is calculated from the distribution of the ranks of each program. The vSDC score of a compound is the number of SD from the mean rank values of all the considered programs that allows us to find the compound in the intersection set. This method provides a number of consensus molecules specified by the user, based on 2 to 12 different docking program results. In this study, all the molecules were re-ranked with vSDC based on Surflex, GOLD and Glide results, either in the presence (14758 different molecules) or the absence (14307 molecules) of ChEMBL actives.

2.5 Similarity

The search for analogs among the ICCL molecules was done using the Canvas FPGen^[31] module of the Schrödinger suite, which provides a selection of 2D fingerprints with the option "atom distinguished by ring size, aromaticity, hydrogen bonds acceptor/donor, ionization potential, whether terminal, whether halogen; bonds distinguished by bond order". Then based on these fingerprints, the Tanimoto similarity metrics^[32] was used with a threshold of 0.7.

2.6 Visual Inspection and Pose Analysis

For each of the 150 vSDC top-ranked molecules (where only **the best-ranked tautomer was considered**) the visual inspection of the 40 docked poses was done with VMD, version 1.9.1.^[22] The retained molecules had to be well buried into the cavity, especially for their hydrophobic parts; they also had to present a good surface complementarity with the binding sites, an optimized number of hydrogen bonds and π - π stacking when possible, considering the relatively high number of aromatic residues in the cavity. The interactions of the docked molecules with the protein were further analyzed using Maestro software version 11.3 of the Schrödinger suite^[19] to draw the Ligand interaction diagrams. In these diagrams five types of interactions were considered: salt bridges, hydrogen bonds, hydrophobic interactions, π - π stacking and π -cation interactions. The π - π stacking, π -cation and hydrophobic interactions are shown at distances below 5.0 Å.^[33] Based on these criteria 10 molecules were chosen for the experimental activity test.

2.7 Anticholinesterase Enzyme Inhibition Assay

Acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (E.C.3.1.1.7, Sigma C 2888), acetylthiocholine iodide (ATCI), 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), dimethyl sulfoxide (DMSO) and the reference compound galantamine were purchased from Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MA, USA). Fourteen molecules described in this study (purity > 95% by liquid chromatography – mass spectrometry or ¹H NMR) came from the ICCL. They were dissolved in DMSO and stored in a 2 mmol.L⁻¹ stock solution.

Acetylcholinesterase inhibitory activity of the selected compounds was evaluated following the Ellman's microplate assay^[34] with some modifications.^[35] Therefore, the wells were filled with 227.3 μl of Ellman's reagent (0.15 mM final concentration of DTNB in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4), 20 μl of AChE solution (final concentration of 0.037 U/ml in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4), and 2.7 μl of test compound solutions in DMSO. For controls, test compound solutions were replaced by the corresponding volume of DMSO. The enzymatic reaction was initiated by the addition of 20 μl of the substrate, ATCI (final concen-

tration 0.21 mM in demineralized water). The final assay volume was 270 μ l. The plate was shaken for 3 s and the increase in absorbance at 412 nm was monitored at 25 °C for 6 minutes using a microplate Spectrophotometer.^[35] Among the well-known AChE inhibitors, galantamine was used as an internal reference standard because it is the best tolerated and the most prescribed AD drug.^[33]

The percentage of inhibition was calculated relative to the control sample, for which the AChE activity was assessed under identical conditions (in presence of DMSO) but in the absence of test compounds. A set of nine concentrations (100 μ M, 50 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M, 0.5 μ M, 0.1 μ M, 0.05 μ M and 0.01 μ M) was used to estimate the IC₅₀, which represents the required concentration of the inhibitor to decrease AChE activity by 50%. All experiments were carried out in triplicate ($n=3$) and each experimental value was expressed as the mean value \pm SD. All IC₅₀ values were calculated by curve fitting according to the classical sigmoidal dose-response equation using GraphPad prism 7.0.^[36,37]

2.8 Drug-likeness Prediction

The pharmacokinetic parameters consisting of blood-brain barrier (BBB) penetration, gastrointestinal absorption (GI), Cytochrome P450 (CYP) inhibition and Lipinski's rule of 5 of compounds **1**, **2** and galantamine were predicted using Suissadme at <http://www.swissadme.ch>. Their cell permeability (COCA-2) and toxicity were predicted using PreAD-MET at <https://preadmet.bmdrc.kr>.

3 Results and Discussion

3.1 Validation of the Structure-based Virtual Screening Protocol

SBVS strategy was undertaken using an original academic chemical library (ICCL), to which we added 451 known AChE inhibitors from the ChEMBL database.^[24] The resulting chemical library, which therefore contained 25260 molecules including the tautomers, was docked into the entire active pocket (CAS and PAS) of AChE using the following docking programs: Glide,^[25,26] GOLD,^[27] Surflex^[28] and FlexX.^[29] The performance of these programs was compared in order to assess their capability to discriminate between the known AChE inhibitors of the ChEMBL database and the other molecules. To do so, and for the rest of the article, we only considered one tautomer for each molecule, the one that was best ranked. For each program, the number of ChEMBL actives found in the 500 top-ranked molecules is given in Table S1, in the Supporting Information. It can be seen that, in our case, Surflex presented the best performance with 221 active molecules found from ChEMBL, followed Glide with 176 molecules and GOLD with 127 and

finally FlexX with only 30. In order to have a more global vision about the performance of each program, the Receiver Operating Characteristic (ROC) curves were calculated (Figure S1, Supporting Information). They show the rate of true actives with respect to the rate of false positives and therefore they necessitate the exact knowledge of the active and inactive molecules of the chemical library, which is not the case here. However, we supposed that, neglecting the small number of the expected actives to be found in ICCL with respect to the big number of the known ChEMBL actives (451) would only introduce a small error. The ROC curves corroborated the above results as to the four programs performance; it showed that, whereas FlexX performance is close to random, those of Surflex, Glide and GOLD are substantially far from it. However, despite their good performance, the results of the three latter programs were divergent (Figure S2, Supporting Information), hence the necessity of using a consensus method.

3.2 The Variable Standard Deviation Consensus Method

In this study, we chose to use vSDC method, which is based on the standard deviation of the molecule ranking^[23] (for some details about the method see Materials and Methods, section 2.4). Considering the poor performance of FlexX, this program was discarded from the subsequent calculations. Therefore, the consensus was obtained using the results of Glide, GOLD and Surflex. vSDC generated a new molecule ranking more efficient than that of the individual programs. Indeed, in the top 500 molecules of the total database, vSDC ranked 233 of the known ChEMBL inhibitors, i.e., 12 molecules more than the best program (Surflex). In addition, the insert in Figure S1 showed the improvement brought by vSDC for the early recognition. After this validation of vSDC, in order to choose the molecules to test experimentally, we discarded from the ranking all ChEMBL actives, except galantamine, the reference molecule, and re-ranked the rest on the basis of their scores.

3.3 Visual Analysis

Using the vSDC ranking, the 150 top-ranked compounds (1% of the screened database excluding the known ChEMBL active molecules, except galantamine) were selected for visual analysis, which was based on a good protein-ligand complementarity (see Materials and Methods for more details). The Tanimoto similarity metrics^[32] was used with a threshold of 0.7 in order to group potential hits into chemical classes. Among the best molecules according to visual analysis, only the vSDC top-ranked molecule of each class was selected for the experimental test. Finally, compounds were checked for ready sample availability from the compound provider and 10 structurally diverse com-

pounds were used for biological assays (Figure S3, Supporting Information).

3.4 Assessment of AChE inhibitory Activity

The AChE inhibitory activity of the 10 selected compounds was performed *in vitro* by a modified Ellman's method.^[34,35] Galantamine was used as an internal reference standard because it is the best tolerated and the most prescribed AD drug.^[33] Their 50% Inhibitory Concentration (IC_{50}) values are given in Table 1a. Eight compounds are active with $IC_{50} \leq 20 \mu M$, of which two molecules, **1** and **2**, are more active than galantamine, the reference compound, and two others, **3** and **4**, have comparable activity. The other compounds were found to be either less or not active. The compounds were numbered according to their inhibition power.

The most promising inhibitors, **1** (derived from isoindolo [2,1-a]indole)^[38] and **2** (derived from the chemical family of bibenzofuran),^[39] were used as starting structures to search for similar compounds from ICCL, employing the Tanimoto metrics.^[32] Four analogs were obtained: one analog to hit **1** and three analogs to hit **2** (Figure S4, Supporting Information). These analogs were tested *in vitro* using the same Ellman's method.^[34,35] They were all found to be active, and still more active than galantamine (Table 1b), although less active than their starting analogs **1** and **2**.

3.5 Assessment of the Quality of SBVS Results

Regarding the SBVS results of the analogs, we observed that they were all ranked by vSDC among the 1% top-ranked molecules, i.e., the 150 first molecules, which was not always the case with the docking programs taken individually (see Table 1). Considering all the tested molecules, including galantamine, many active compounds could have been missed without the use of vSDC. Indeed, if this study were only based on Surflex results, 4 actives would have been missed (their rank was over 150), or based on GOLD results, 8 actives would have been missed and 7 actives if it were only based on Glide results. The ranking of the active compounds was generally improved by the use of the consensus method compared to that obtained by the individual programs (Figure S5, Supporting Information). For instance, for the most active molecule **1**, which was ranked in the 54th position with vSDC, its rank was 75 with Glide, 209 with GOLD and 122 with Surflex, and for the standard reference molecule, galantamine, its rank was 139 with vSDC, while it was 1565 with Glide, 1464 with GOLD and 168 with Surflex. However, it is the combination of the use of vSDC and the visual inspection that produced the incredibly good yield of 86% observed here, the yield being the ratio of hits found (12 hits) to the number of tested compounds (14 compounds).

Table 1. Comparison of experimental and SBVS results. For each compound, its AChE inhibitory activity, or IC_{50} , is expressed as the triplicate mean value \pm SD. The virtual screening rank is actually a re-ranking after the exclusion of ChEMBL actives from the database. This re-ranking was based on the scores (in parenthesis) obtained by vSDC (number of SD), Glide (ΔG , kcal/mol), GOLD (a.u.) and Surflex (pK_d) of (a) the selected compounds and (b) the analog compounds of **1** and **2**.

Compound	$IC_{50} \pm SD$ (μM) ($n=3$)	Virtual screening rank (docking score)			
		vSDC	Glide	GOLD	Surflex
(a) Compounds selected from SBVS					
1	0.0473 ± 0.0003	54 (1.43)	75 (−11.20)	209 (140.98)	122 (12.47)
2	0.1998 ± 0.0147	38 (1.50)	708 (−9.37)	40 (155.61)	47 (13.64)
Galantamine	0.7739 ± 0.0239	139 (1.12)	1565 (−8.72)	1464 (124.40)	168 (12.06)
3	0.8243 ± 0.0598	26 (1.60)	118 (−10.77)	707 (131.01)	24 (14.13)
4	1.0780 ± 0.1470	5 (2.08)	40 (−11.69)	24 (158.50)	6 (15.0)
5	1.3470 ± 0.0325	1 (2.27)	1 (−13.61)	174 (142.57)	10 (14.72)
6	5.2260 ± 1.7040	11 (1.90)	60 (−11.40)	184 (142.25)	20 (14.22)
7	6.8510 ± 0.5930	98 (1.24)	1245 (−8.89)	72 (149.18)	271 (11.34)
8	20.5200 ± 3.853	4 (2.02)	8 (−13.08)	53 (153.82)	11 (14.69)
9	≥ 100	109 (1.18)	722 (−9.36)	214 (140.78)	244 (11.53)
10	≥ 100	21 (1.73)	12 (−12.76)	162 (143.27)	21 (14.21)
(b) Analog compounds					
2a ^[a]	0.4868 ± 0.0180	32 (1.55)	185 (−10.43)	178 (142.51)	71 (13.13)
1a ^[b]	0.5270 ± 0.0460	128 (1.14)	757 (−9.31)	266 (139.09)	286 (11.23)
2b ^[a]	0.6170 ± 0.02010	117 (1.16)	1482 (−8.76)	41 (155.39)	46 (13.65)
2c ^[a]	0.7520 ± 0.0090	135 (1.13)	688 (−9.39)	196 (141.44)	310 (11.06)

^[a] Analog to **2**. ^[b] Analog to **1**.

3.6 Pose Analysis

The binding mode of the potent inhibitors **1** and **2** into the AChE binding site was predicted using the poses given by the SBVS results. All the 40 poses given by Surflex, Glide and GOLD, were inspected, but only poses obtained by

Surflex for molecule **1** and by Glide for molecule **2** were retained. As shown in Figure 2, these two compounds are big enough 17.26 and 17.81 Å, respectively, to cover both the CAS and PAS sites of AChE, thus leading to an inhibitory potency higher than that of galantamine, which mainly binds to the CAS.^[10] Both **1** and **2** occupy the PAS in a

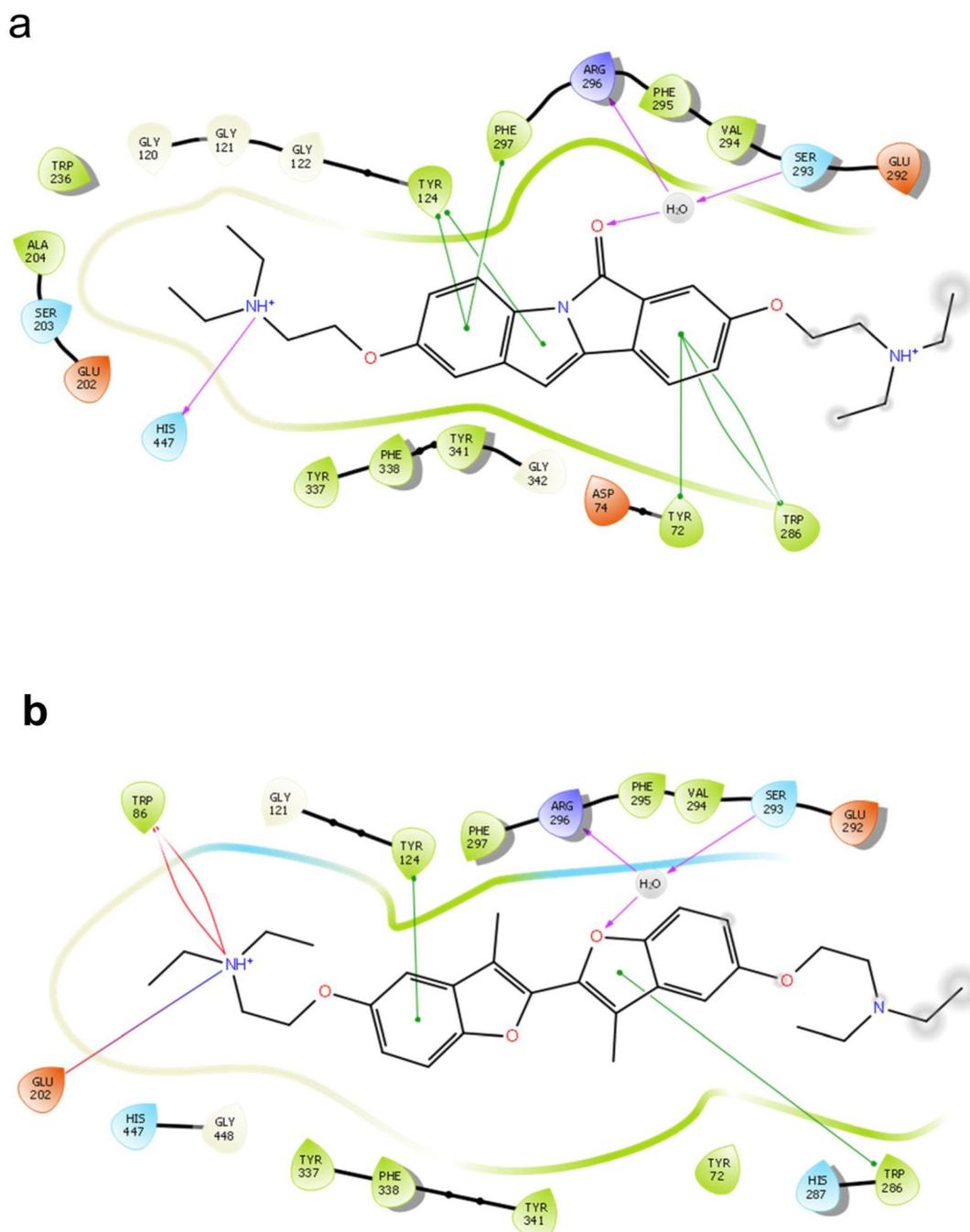


Figure 2. Binding mode prediction of **1** (a) and **2** (b) into the entire AChE active pocket. Purple arrows head from the donor to the acceptor of hydrogen bonds, red lines represent π -cation interactions, green lines π - π stacking and half purple-half red lines salt bridges. The gray circle dimensions are proportional to the accessibility to the solvent. The images were done with the Ligand Interaction Diagram script from the Schrödinger Suite.^[19]

rational orientation. **1** makes strong π - π stacking with Tyr72, Tyr124 and Trp286, whereas **2**, which also makes the stacking with the two latter residues, has bare contacts with Tyr72. These three residues were described to play an important role in the ligand binding in the PAS.^[14] In addition, **1** and **2** establish a hydrogen bond with a structural water molecule, which therefore connects the ligands to Ser293 and Arg296. In the CAS, the aminium groups of both ligands form hydrogen bonds with either His447 from the catalytic triad (for **1**) or Glu202 (for **2**). However, the difference of the inhibitory potency between these two compounds may be explained by the different number of π - π stacking interactions between them and the protein. Indeed, whereas **1** is involved in six such interactions, **2** is involved in only two.

Compound **1a**, the analog of **1**, although having π - π stacking interactions as numerous as those of **1**, presents an inhibitory potency 11 fold less because it is not buried enough into the cavity due to the lack of one of its substituents (Figure 3).

All the analogs of **2** have two [2-(diethylamino)ethoxy] substituents, which only differ in their positions. These substituents are in positions 5,5' for **2**, and **2b**, in positions

5,6' for **2c** and in positions 6,6' for **2a** (Figure 4). Another difference between these compounds is the presence of two methyl groups in positions 3,3' for **2** and **2a**. The analysis of the incidence of these differences shows that: 1) the presence of the substituents in positions 5,5' results in a bent molecule that fits well into the cavity, but that does not fill it as well (with less contacts) in the absence of the methyl groups (**2b**) as in their presence (**2**), in which case these groups are in opposite orientations; 2) when the substituents are in positions 6,6' the molecule **2a** is straight, which imposes to the methyl groups to be in the same orientation and to the substituent in 6' to pass between Trp286 and Glu292, instead of pointing towards Tyr72 as for **2** and **2b**; 3) Finally, when the substituents are in positions 5,6' (**2c**) the molecule is bent in the opposite way compared to **2**, to be able to accommodate the cavity. Remarkably, the presence of the two methyl groups seems to increase the affinity of the compounds, as for **2** and **2a**, where the two [2-(diethylamino)ethoxy]substituents are placed in positions 5,5' and 6,6', respectively.

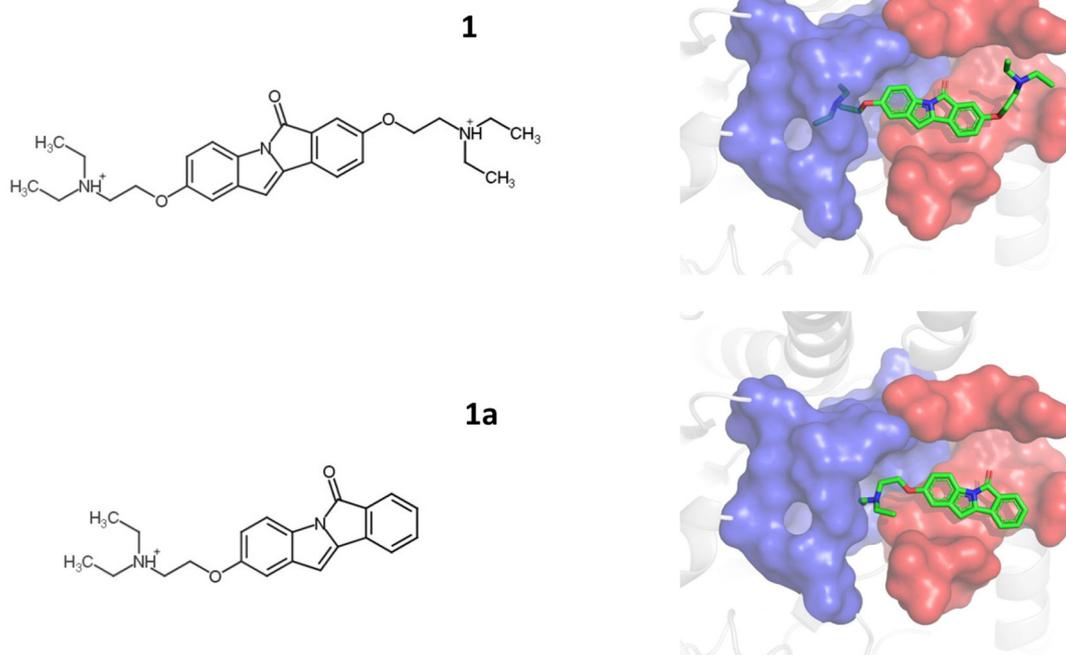


Figure 3. Compound **1** and its analog. The 2D Structures of **1** and its analog, **1a** are presented in the descending order of their affinity to AChE (left panels). The orientation of each 2D molecule core is similar to the corresponding 3D most plausible pose within the AChE active pocket (right panels), as obtained by docking with Surflex. Residue Tyr341, which covers the ligand in the pocket, is omitted for clarity. The CAS region of the cavity is represented in blue and the PAS in red. The color code of the ligand atoms is the following: carbon in green, oxygen in red and nitrogen in blue. The 2D images of the left panels were drawn with MarvinSketch^[40] and the 3D images of the right panels with PyMol.^[41]

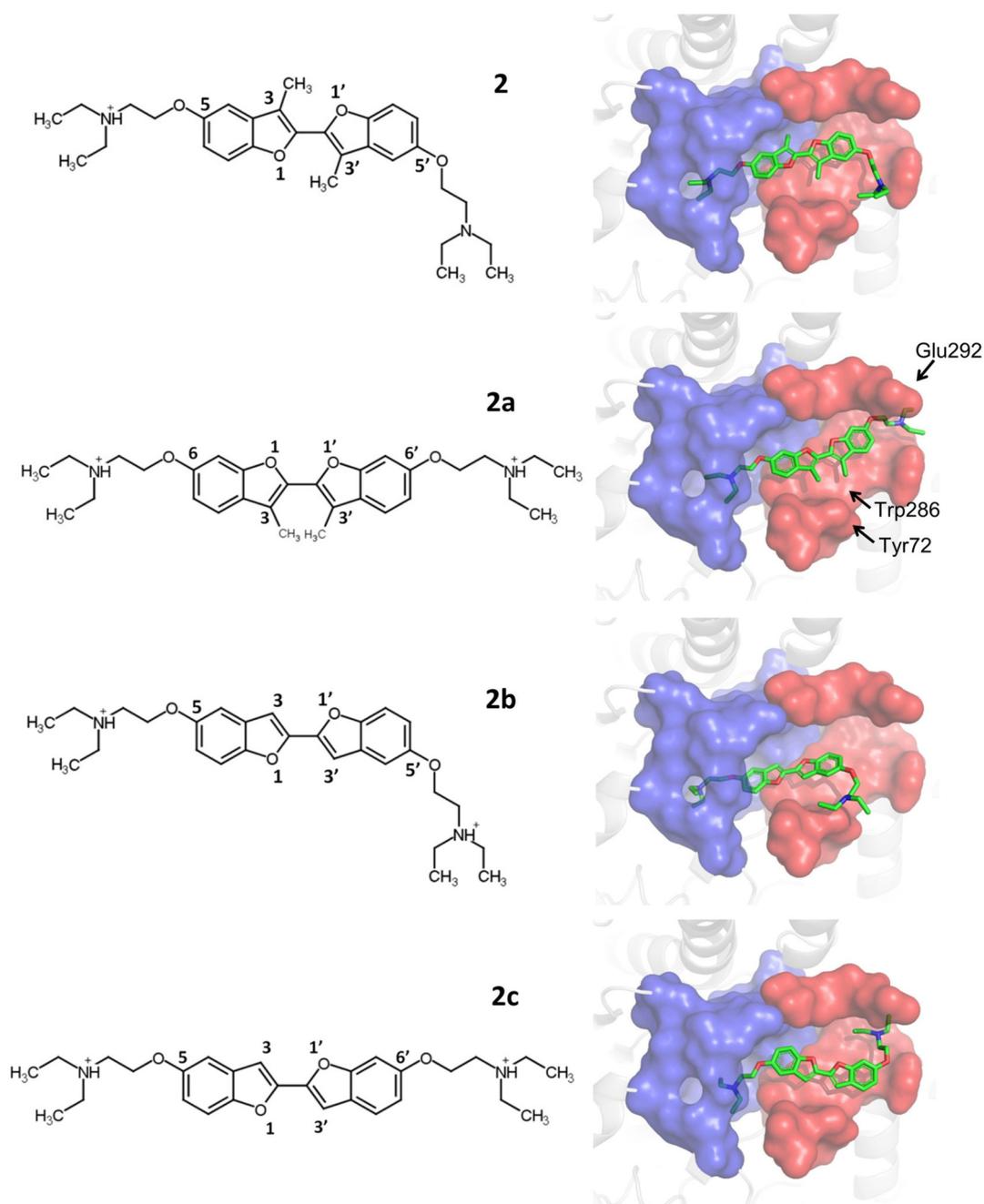


Figure 4. Compound **2** and its analogs. The 2D Structures of **2** and its analogs, **2a**, **2b** and **2c** are presented in the descending order of their affinity to AChE (left panels). The orientation of each 2D molecule core is similar to the corresponding 3D most plausible pose within the AChE active pocket (right panels), as obtained by docking with Glide. Residue Tyr341, which covers the ligand in the pocket, is omitted for clarity. The same color code as Figure 3 is used.

3.7 Drug-likeness Prediction

Finally, we predicted the pharmacokinetic and toxicity parameters of the most promising hits (**1** and **2**) using Suissadme at <http://www.swissadme.ch> and PreADMET at <https://preadmet.bmdrc.kr>. These parameters consist of their blood-brain barrier (BBB) penetration, gastrointestinal

absorption (GI), Cytochrome P450 (CYP) inhibition, Lipinski's rule of 5, cell permeability (COCA-2) and toxicity. The same properties of galantamine were also predicted for comparison.

As shown in Table 2, **1** and **2** had a good BBB penetration, which is an important property for the agent treating central nervous system diseases. They also showed

Table 2. The predicted pharmacokinetic and toxicity parameters of **1**, **2** and galantamine.

Properties	1	2	galantamine
BBB	Yes	Yes	Yes
GI	High	High	High
CYP inhibitor	No	No	CYP2D6
COCA-2 ^[a]	56.3883	26.8246	20.9301
Lipinski's rule of 5	Suitable	Suitable	Suitable
Toxicity	CR ^[b] hERG inhibition ^[c]	CR	Negative

^[a] COCA-2: human colorectal carcinoma 2 cell permeability (nm/sec). ^[b] CR: carcinogenicity in rat. ^[c] hERG inhibition: human ether-a-go-go related gene channel inhibition.

a high possibility in gastrointestinal absorption. Moreover, these compounds were predicted to have higher COCA-2 cell permeability than that of galantamine, which insures their *in vivo* usage. Furthermore, they were not found to inhibit CYP (enzymes that should not be inhibited because they are essential for the metabolism of many drugs in the liver) contrary to galantamine, which inhibits CYP2D6. With no Lipinski's rule of 5 violation, both **1** and **2** follow the criteria for orally available drugs. However, their toxicity problems including CR and hERG inhibition for **1** and CR for **2** can be improved during their optimization.

4 Conclusions

In brief, this work demonstrates once more the interest of using SBVS in combination with *in vitro* experiments to find new hits for a protein target. However, the yield of SBVS is usually rather low (about 2%), requiring the experimental test of several hundreds of molecules to find only a few hits, whereas the strategy followed in the present work, consisting of the use of a consensus method, vSDC, followed by a scrupulous visual inspection, allowed us to obtain an incredibly high yield of 86%. Indeed, among the overall 14 molecules tested by the *in vitro* AChE inhibitory assay, 12 hits were identified, of which 6 were more active than galantamine, the reference inhibitor. The analysis of the pose of the two most active inhibitors, **1** and **2**, showed that these promising hits cover the binding site of AChE in a rational orientation, where their π - π stacking with Tyr124 and Trp286 seems to play an important role, leading to their high inhibitory potency. They also possess satisfying drug-like properties, indicating that they might be promising lead compounds for further research.

Abbreviations

ACh	Acetylcholine
AChE	Acetylcholinesterase
AD	Alzheimer's Disease

ATCI	Acetylthiocholine iodide
BBB	Blood-brain barrier
CAS	Catalytic site
COCA-2	Human colorectal carcinoma 2
CR	Carcinogenicity in rat
CYP	Cytochrome P450
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DTNB	5,5-dithiobis- (2-nitrobenzoic acid)
hERG	human ether-a-go-go related gene channel
IC ₅₀	50% Inhibitory Concentration
ICCL	Institut Curie–CNRS Chemical Library
GI	Gastrointestinal absorption
PAS	Peripheral site
ROC	Receiver Operating Characteristic
SBVS	Structure-Based Virtual Screening
SD	Standard deviation
vSDC	variable Standard Deviation Consensus

Conflict of Interest

None declared.

Acknowledgements

The authors gratefully thank the Biotechnology research Center (CRBt) of Constantine, especially Mr Chawki BENSOUICI for allowing them to perform *in vitro* AChE inhibitory activity experiments. SBVS studies were funded by the French program "Investissement d'Avenir – Institut Carnot" managed by the National Research Agency (ANR-11-CARN-008-01).

References

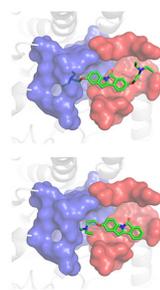
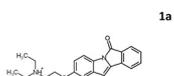
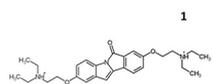
- [1] J. M. Michael, F. M. Catherine, *Complications in anesthesia*. Vol 2 (Eds: JOHN L ATLEE), **2007**, 1040 pp.
- [2] E. K. Perry, M. Walker, J. Grace, R. H. Perry, *Trends Neurosci.* **1999**, *22*, 273–280.
- [3] E. K. Perry, B. E. Tomlinson, G. Blessed, K. Bergmann, P. H. Gibson, R. H. Perry, *Br. Med. J.* **1978**, *25*, 1457–1459.
- [4] P. Draczkowski, A. Tomaszuk, P. Halczuk, M. Strzemeski, D. Matosiuk, K. Jozwiak, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2015**, *15*, 967–974.
- [5] J. K. Dhanjal, S. Sharma, A. Grover, A. Das, *Biomed. Pharmacother.* **2015**, *71*, 146–152.
- [6] S. Chigurupati, M. Selvaraj, V. Mani, K. K. Selvarajan, I. M. Jahidul, B. Kaveti, H. Bera, V. R. Palanimuthu, Lay Kek Teh, Z. S. Mohd, *Bioorg. Chem.* **2016**, *67*, 9–17.
- [7] R. M. Lane, M. Kivipelto, N. H. Greig, *Clin. Neuropharmacol.* **2004**, *27*, 141–149.
- [8] M. Galisteo, M. Rissel, O. Sergent, M. Chevanne, J. Cillard, A. Guillouzo, D. Lagadic-Gossmann, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *294*, 160–167.
- [9] N. Chitranshi, S. Gupta, P. K. Tripathi, P. K. Seth, *Med. Chem. Res.* **2013**, *22*, 2328–2345.

- [10] J. Cheung, M. J. Rudolph, F. Burshteyn, M. S. Cassidy, E. N. Gary, J. Love, M. C. Franklin, J. J. Height, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10282–10286.
- [11] H. Dvir, I. Silman, M. Harel, T. L. Rosenberry, J. L. Sussman, *Chem.-Biol. Interact.* **2010**, *187*, 10–22.
- [12] D. M. Quinn, *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 955–975.
- [13] Y. Bourne, P. Taylor, Z. Radic, P. Marchot, *EMBO J.* **2003**, *22*, 1–12.
- [14] T. Szegletes, W. D. Mallender, P. J. Thomas, T. L. Rosenberry, *Biochem.* **1999**, *38*, 122–133.
- [15] J. P. Changeux, *Mol. Pharmacol.* **1966**, *2*, 369–392.
- [16] T. L. Rosenberry, L. K. Sonoda, S. E. Dekat, B. Cusack, J. L. Johnson, *Biochemistry.* **2008**, *47*, 13056–13063.
- [17] P. Taylor, S. Lappi, *Biochemistry.* **1975**, *14*, 1989–1997.
- [18] J. Cheung, E. N. Gary, K. Shiomi, T. L. Rosenberry, *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *11*, 1091–1096.
- [19] Schrodinger Release 2015-1: Maestro, version 10.1, Schrodinger, LLC, New York, 2015.
- [20] Schrodinger Suite 2009 Protein Preparation Wizard. In., Epik version 2.0; Impact version 5.5; Prime version 2.1 edn: Schrodinger, LLC, New York; 2009.
- [21] L. Chaput, J. Martinez-Sanz, N. Saettel, L. Mouawad, *J. Cheminform.* **2016**, *8*:56.
- [22] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, *J. Mol. Graphics Modell.* **1996**, *14*, 33–38.
- [23] L. Chaput, J. Martinez-Sanz, E. Quiniou, P. Rigolet, N. Saettel, L. Mouawad, *J. cheminform.* **2016**, *8*:1.
- [24] ChEMBL database version 23, <https://www.ebi.ac.uk/chembl/>.
- [25] T. A. Halgren, R. B. Murphy, R. A. Friesner, H. S. Beard, L. L. Frye, W. T. Pollard, J. L. Banks, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1750–1759.
- [26] R. A. Friesner, R. B. Murphy, M. P. Repasky, L. L. Frye, J. R. Greenwood, T. A. Halgren, P. C. Sanschagrin, D. T. Mainz, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6177–6196.
- [27] G. Jones, P. Willett, R. C. Glen, *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 43–53.
- [28] A. N. Jain, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 499–511.
- [29] M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **1996**, *261*, 470–489.
- [30] L. Chaput, L. Mouawad, *J. Cheminf.* **2017**, *9*, 37–55.
- [31] J. Duan, S. L. Dixon, J. F. Lowrie, W. Sherman, *J. Mol. Graphics Modell.* **2010**, *29*, 157–170.
- [32] T. T. Tanimoto. An elementary mathematical theory of classification and prediction. International Business Machines Corporation. **1958**.
- [33] M. Atanasova, G. Stavrakov, I. Philipova, D. Zheleva, N. Yordanov, I. Doytchinov, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 5382–5389.
- [34] G. L. Ellman, D. Courtney, J. V. Andres, R. M. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88–95.
- [35] S. Di Giovanna, A. Borloz, A. Urbain, A. Marston, K. Hostettmann, P. A. Carrupt, M. Reist, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2008**, *33*, 109–119.
- [36] N. Khunnawutmanotham, N. Chimnoi, P. Saparpakorn, S. Techasaku, *Bioorg. Chem.* **2016**, *65*, 137–145.
- [37] GraphPad Software **2016**. GraphPad prism version 7. San Diego, California. <https://www.graphpad.com>.
- [38] J. Guillaumel, S. Léonce, A. Pierre, P. Renard, B. Pfeiffer, L. Peruchon, P. B. Arimondo, C. Monnere, *Oncol. Res.* **2003**, *13*, 537–549.
- [39] J. Guillaumel, R. Royer, *J. Heterocycl. Chem.* **1986**, *23*, 1277–1282.
- [40] MarvinSketch version 15.9.7, ChemAxon, 2015. Cambridge, USA; <https://www.chemaxon.com>.
- [41] The PyMOL Molecular Graphics System Version 2.2.3. Schrodinger, LLC, available at <https://pymol.org>.

Received: September 17, 2018

Accepted: January 9, 2019

Published online on ■ ■ ■



E. H. Mokrani, A. Bensegueni, L. Chaput, C. Beauvineau, H. Djeghim, L. Mouawad*

1 – 11

Identification of New Potent Acetylcholinesterase Inhibitors Using Virtual Screening and *In Vitro* Approaches



Supporting Information

© Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 69451 Weinheim, 2019

Identification of New Potent Acetylcholinesterase Inhibitors Using Virtual Screening and *In Vitro* Approaches

El Hassen Mokrani, Abderrahmane Bensegueni, Ludovic Chaput, Claire Beauvineau,
Hanane Djeghim, and Liliane Mouawad*

Table S1. Number of actives found in the 500 top-ranked molecules.

Method	Number of ChEMBL actives
vSDC	233 (47%)
Surflex	221 (44%)
Glide	176 (35%)
GOLD	127 (25%)
FlexX	30 (6%)

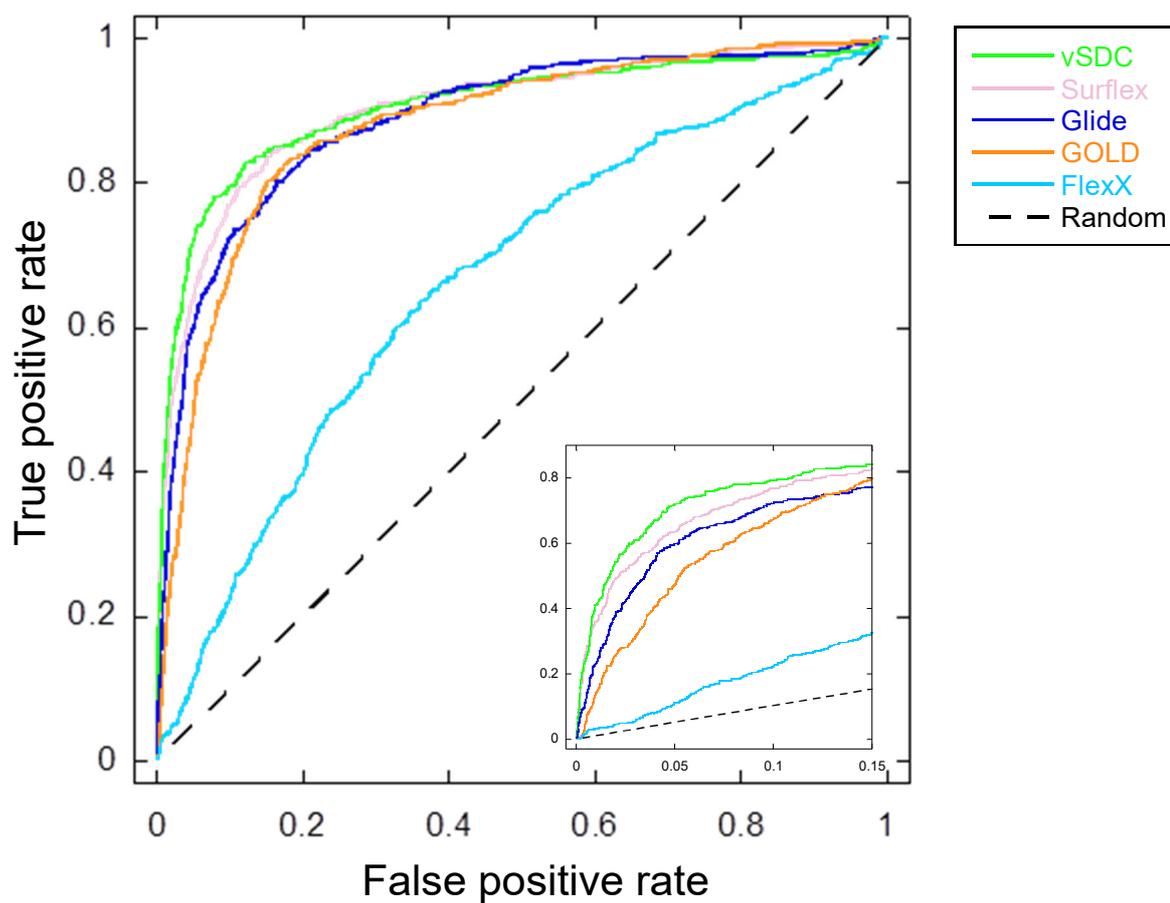


Figure S1. ROC curves of the various methods. The ROC curves were calculated assuming all the ICCL molecules are not active, although this is not the case. The insert is a zoom on the curves that shows the improvements brought by vSDC for the early recognition

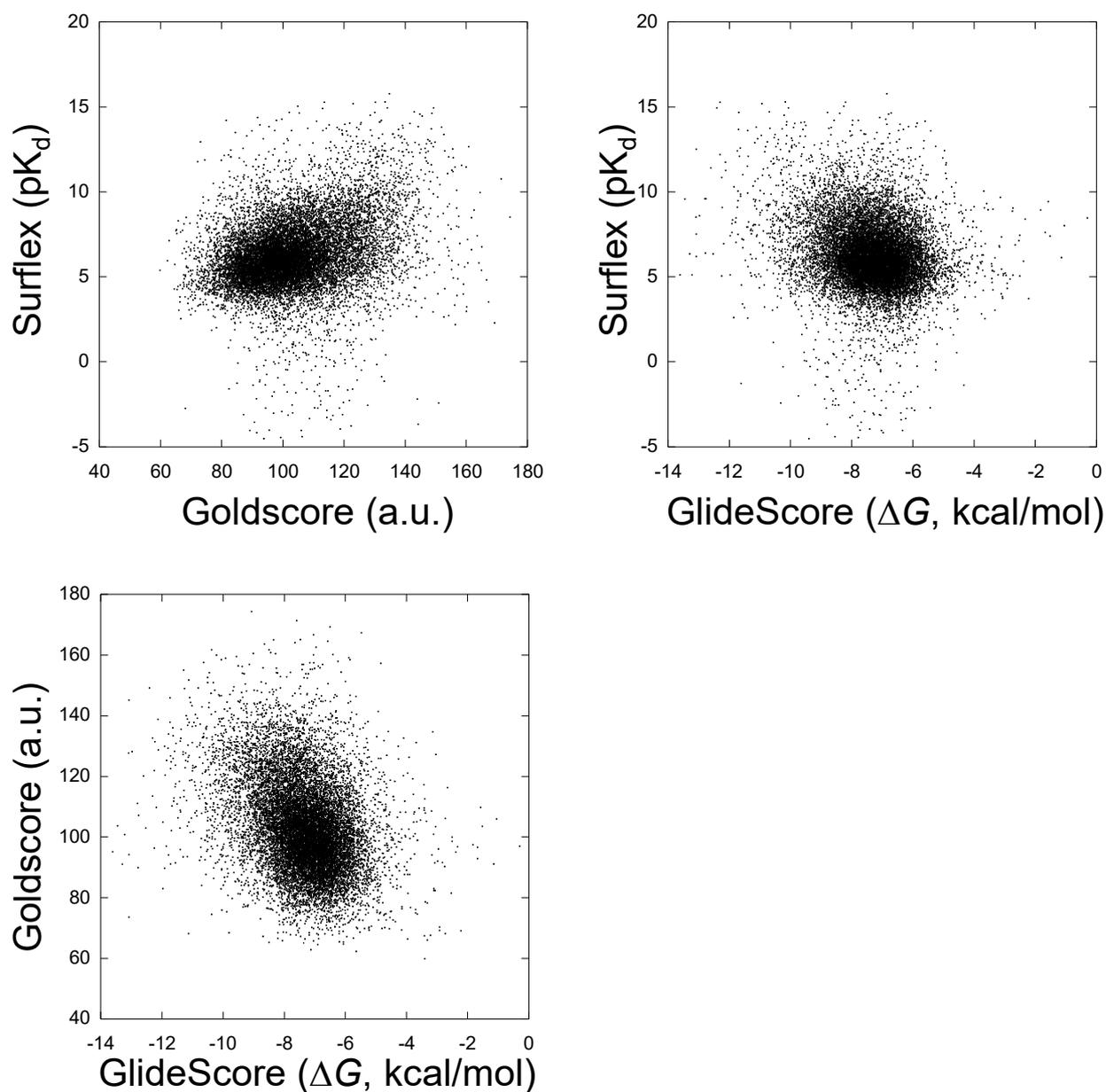


Figure S2. Comparison of the results of Surflex, Glide and GOLD. For each compound, whether it be from ChEMBL or from ICCL, the score given by a program is reported with respect to another program. The molecules are ranked by Surflex and GOLD according to their score descending order, whereas they are ranked according to their score ascending order by Glide.

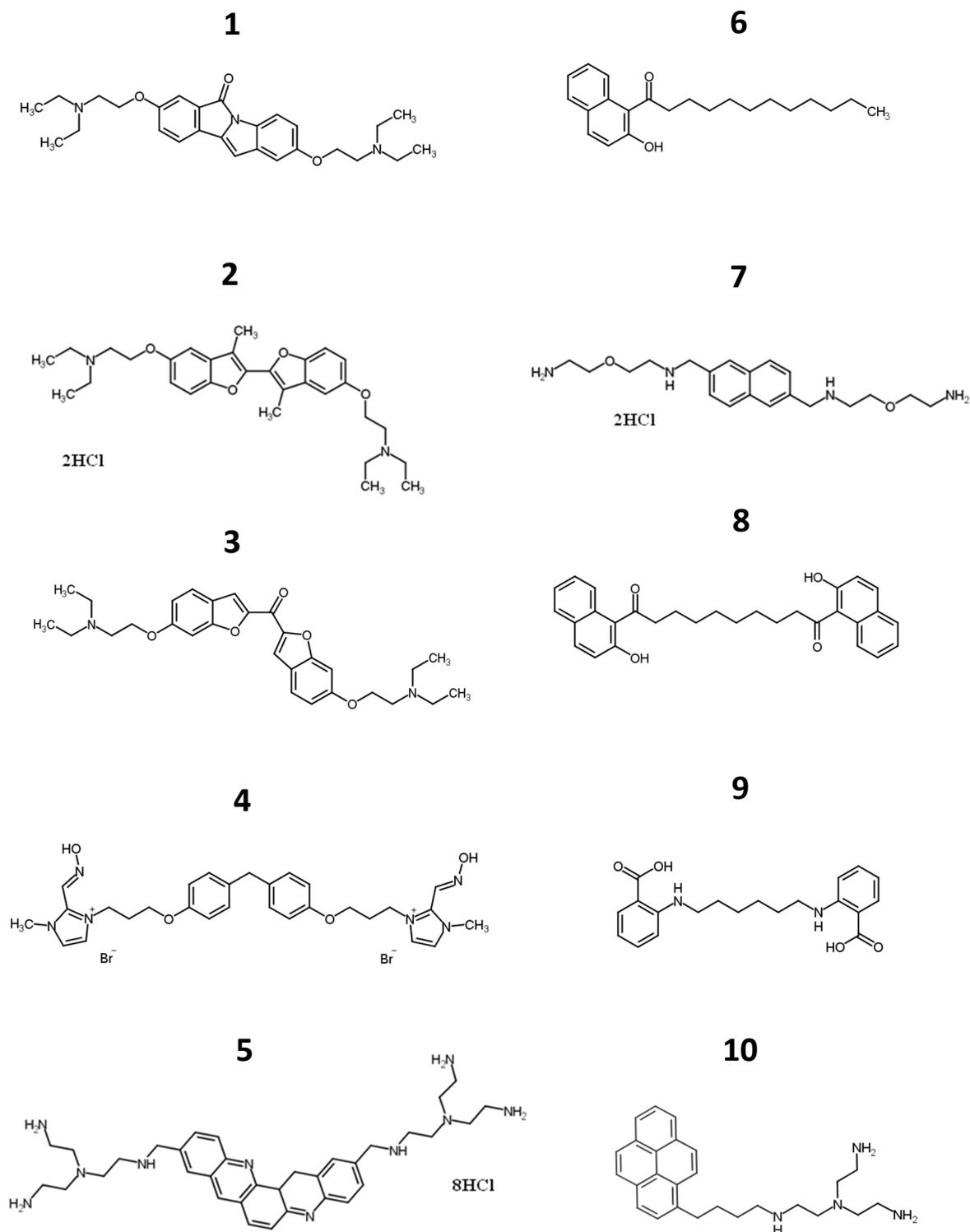


Figure S3. Chemical structure of the selected compounds. The selection was based on the SBVS results. The compounds are presented in the descending order of their affinity to AChE. In the left panel are depicted the molecules with $IC_{50} < 2 \mu M$.

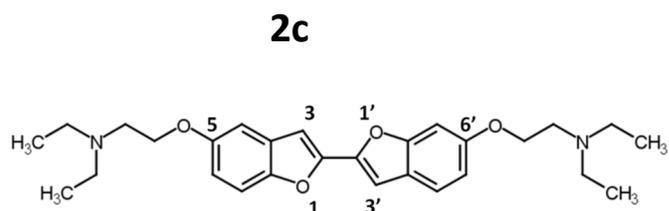
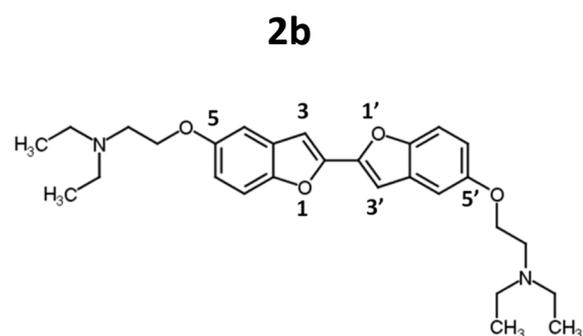
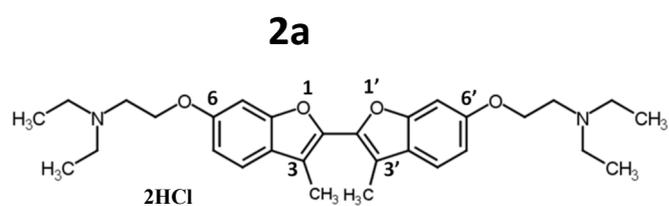
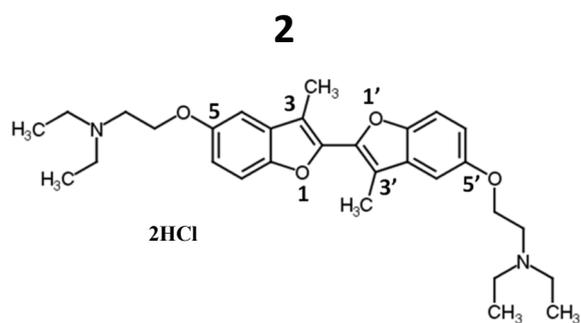
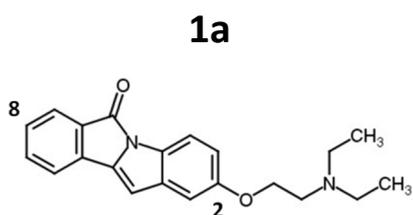
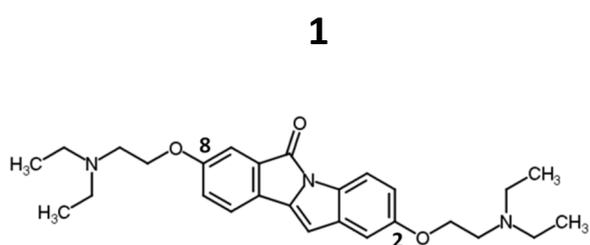


Figure S4. The two most active compounds and their analogs. The 2D structures of **1** and its analog (**1a**) and of **2** and its analogs (**2a**, **2b** and **2c**).

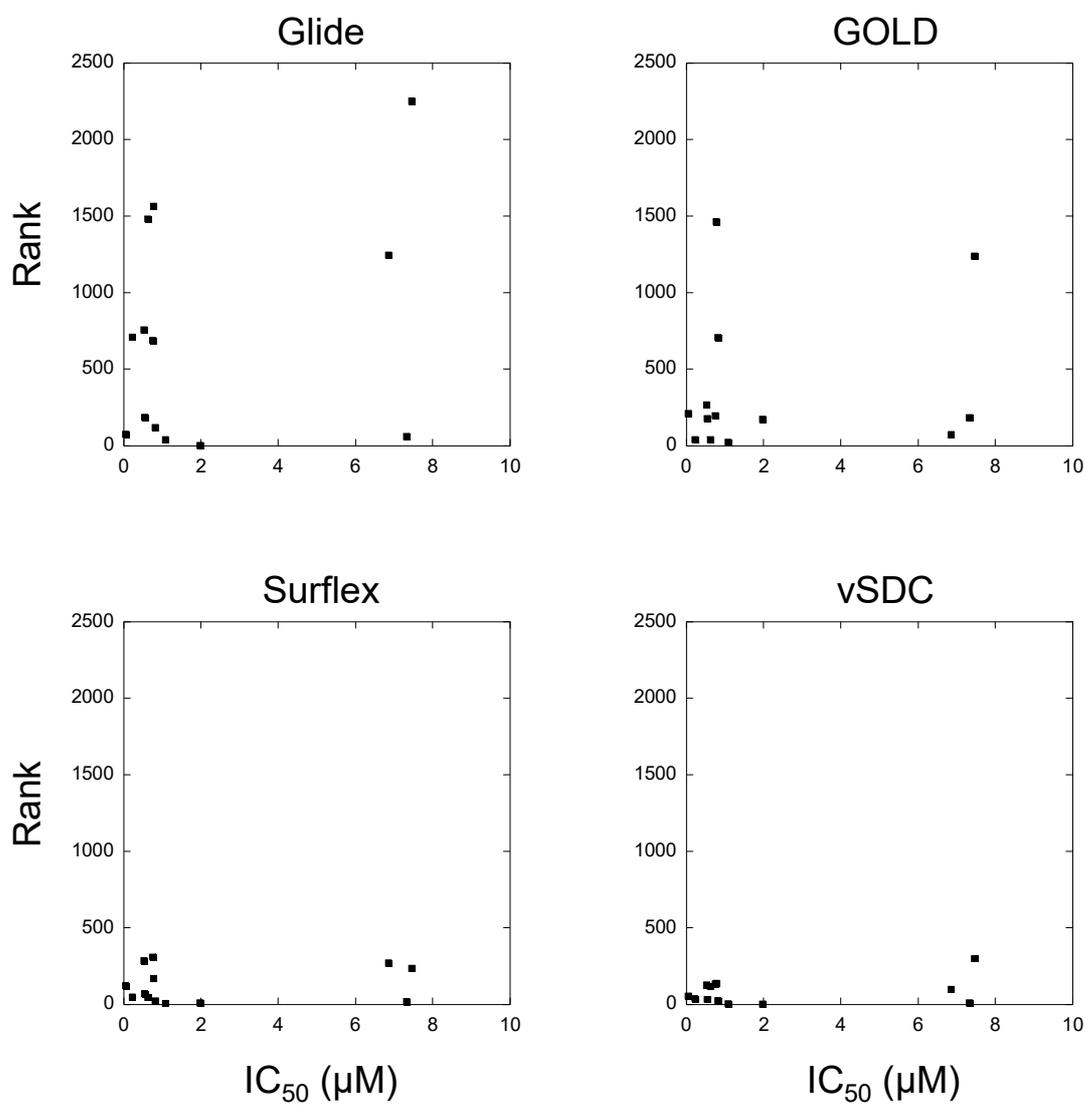


Figure S5. Comparison between the SBVS ranking and IC_{50} . Only the most active molecules, with $IC_{50} < 10 \mu M$, are presented.

Annexes

Annexe 1. Contenu des fichiers comportant la liste des résidus du site actif de l'AChE.

```
72 74 82 86 120 121 122 124 125 133 202 203 286 289 292 293 294 295 296  
297 334 337 338 341 342 447 448 449 451 701 702 703 704
```

Format Glide : Seuls, les numéros des résidus acides aminés du site actif de l'AChE sont représentés et séparés par des espaces.

```
TYR72 ASP74 GLY82 TRP86 GLY120 GLY121 GLY122 TYR124 SER125 TYR133  
GLU202 SER203 TRP286 LEU289 GLU292 SER293 VAL294 PHE295 ARG296 PHE297  
GLU334 TYR337 PHE338 TYR341 GLY342 HIS447 GLY448 TYR449 ILE451 WAT701  
WAT702 WAT703 WAT704
```

Format Gold : chaque acide aminé du site actif est représenté par son abréviation en 3 lettres majuscules suivie par son numéro (attachés). Les acides aminés sont séparés par des espaces

```
TYR-72, ASP-74, GLY-82, TRP-86, GLY-120, GLY-121, GLY-122, TYR-124, SER-  
125, TYR-133, GLU-202, SER-203, TRP-286, LEU-289, GLU-292, SER-293, VAL-  
294, PHE-295, ARG-296, PHE-297, GLU-334, TYR-337, PHE-338, TYR-341, GLY-  
342, HIS-447, GLY-448, TYR-449, ILE-451, WAT-701, WAT-702, WAT-703, WAT-704
```

Format FlexX : Chaque acide aminé est représenté par son abréviation en 3 lettres majuscules, suivie par un tiré «-» puis son numéro. Les acides aminés sont séparés par des virgules « , ».

TYR72
ASP74
GLY82
TRP86
GLY120
GLY121
GLY122
TYR124
SER125
TYR133
GLU202
SER203
TRP286
LEU289
GLU292
SER293
VAL294
PHE295
ARG296
PHE297
GLU334
TYR337
PHE338
TYR341
GLY342
HIS447
GLY448
TYR449
ILE451
WAT701
WAT702
WAT703
WAT704

Format Surfex : Chaque ligne contient l'abréviation en 3 lettres majuscules suivie par le numéro du résidu acide aminé (attaché).

Annexe 2. Paramètres par défaut de l'algorithme génétique de Gold.

```
GOLD CONFIGURATION FILE

AUTOMATIC SETTINGS
autoscale = 1

POPULATION
popsiz = auto
select_pressure = auto
n_islands = auto
maxops = auto
niche_siz = auto

GENETIC OPERATORS
pt_crosswt = auto
allele_mutatewt = auto
migratewt = auto

FLOOD FILL
radius = 10
origin = 0 0 0
do_cavity = 0
floodfill_atom_no = 0
cavity_file =
../../././structure_pdb/liste_residues_rayon_format_gold.dat
floodfill_center = list_of_residues

DATA FILES
ligand_data_file
/home/lchaput/chimiotheques/Preparation_ICC_decembre2013/Preparation
_schrodinger/split_chimiotheque_sdf/ICC2014_ligid_1.sdf 10
.
.
ligand_data_file
/home/emokrani/Projet/Preparation_actives_DUDE/split_chimiotheque_sd
f/ICC2014_ligid_CHEMBL9751.sdf 10

param_file = DEFAULT
set_ligand_atom_types = 1
set_protein_atom_types = 0
directory = results/
tordist_file = DEFAULT
make_subdirs = 1
save_lone_pairs = 1
fit_points_file = fit_pts.mol2
read_fitpts = 0

FLAGS
internal_ligand_h_bonds = 1
flip_free_corners = 0
match_ring_templates = 0
```

```
flip_amide_bonds = 0
flip_planar_n = 1 flip_ring_NRR flip_ring_NHR
flip_pyramidal_n = 1
rotate_carboxylic_oh = flip
use_tordist = 1
postprocess_bonds = 1
rotatable_bond_override_file = DEFAULT
solvate_all = 1

TERMINATION
early_termination = 1
n_top_solutions = 3
rms_tolerance = 1.5

CONSTRAINTS
force_constraints = 0

COVALENT BONDING
covalent = 0

SAVE OPTIONS
save_score_in_file = 1
save_protein_torsions = 1
clean_up_option save_top_n_solutions 20
clean_up_option delete_redundant_log_files
clean_up_option delete_empty_directories
save_option save_clustered_solutions 0.75
output_file_format = MOL2

FITNESS FUNCTION SETTINGS
initial_virtual_pt_match_max = 3
relative_ligand_energy = 1
gold_fitfunc_path = consensus_score
start_vdw_linear_cutoff = 6
score_param_file = DEFAULT
docking_fitfunc_path = plp
docking_param_file = DEFAULT
rescore_fitfunc_path = goldscore
rescore_param_file = DEFAULT

PARALLEL OPTIONS
hostfile = gold2.hosts

RUN TYPE
run_flag = CONSENSUS

WATER DATA
water 4189 on toggle
water 4190 on toggle
water 4191 on toggle
water 4192 on toggle

PROTEIN DATA
protein_datafile =
../../././structure_pdb/4M0E_ligprep_4H2O_sidechains_optimized_orient
_correct.mol2
```

Annexe 3. Quelques lignes du fichier comportant la première liste des composés de la chimiothèque à cribler virtuellement par Surflex. Le chemin vers le fichier (.sdf) relative à chaque composé doit figurer dans cette liste.

```
/home/lchaput/chimiotheques/Preparation_ICC_decembre2013/Preparation  
_schrodinger/split_chimiotheque_sdf/ICC2014_ligid_1.sdf  
/home/lchaput/chimiotheques/Preparation_ICC_decembre2013/Preparation  
_schrodinger/split_chimiotheque_sdf/ICC2014_ligid_2.sdf  
/home/lchaput/chimiotheques/Preparation_ICC_decembre2013/Preparation  
_schrodinger/split_chimiotheque_sdf/ICC2014_ligid_3.sdf  
/home/lchaput/chimiotheques/Preparation_ICC_decembre2013/Preparation  
_schrodinger/split_chimiotheque_sdf/ICC2014_ligid_3-2.sdf  
/home/lchaput/chimiotheques/Preparation_ICC_decembre2013/Preparation  
_schrodinger/split_chimiotheque_sdf/ICC2014_ligid_4.sdf  
/home/lchaput/chimiotheques/Preparation_ICC_decembre2013/Preparation  
_schrodinger/split_chimiotheque_sdf/ICC2014_ligid_5.sdf  
/home/lchaput/chimiotheques/Preparation_ICC_decembre2013/Preparation  
_schrodinger/split_chimiotheque_sdf/ICC2014_ligid_5-2.sdf  
/home/lchaput/chimiotheques/Preparation_ICC_decembre2013/Preparation  
_schrodinger/split_chimiotheque_sdf/ICC2014_ligid_6.sdf  
/home/lchaput/chimiotheques/Preparation_ICC_decembre2013/Preparation  
_schrodinger/split_chimiotheque_sdf/ICC2014_ligid_6-2.sdf  
/home/lchaput/chimiotheques/Preparation_ICC_decembre2013/Preparation  
_schrodinger/split_chimiotheque_sdf/ICC2014_ligid_7.sdf  
/home/lchaput/chimiotheques/Preparation_ICC_decembre2013/Preparation  
_schrodinger/split_chimiotheque_sdf/ICC2014_ligid_7-2.sdf  
/home/lchaput/chimiotheques/Preparation_ICC_decembre2013/Preparation  
_schrodinger/split_chimiotheque_sdf/ICC2014_ligid_8.sdf  
/home/lchaput/chimiotheques/Preparation_ICC_decembre2013/Preparation  
_schrodinger/split_chimiotheque_sdf/ICC2014_ligid_9.sdf  
/home/lchaput/chimiotheques/Preparation_ICC_decembre2013/Preparation  
_schrodinger/split_chimiotheque_sdf/ICC2014_ligid_10.sdf  
/home/lchaput/chimiotheques/Preparation_ICC_decembre2013/Preparation  
_schrodinger/split_chimiotheque_sdf/ICC2014_ligid_11.sdf
```

Annexe 4. Les paramètres contrôlant la sélection et l'emplacement des fragments appliqués selon la configuration par défaut du programme FlexX.

```
# Docking
set verbosity 10

# Lecture du receptor
RECEPTOR
  READ
  ../../structure_pdb/4M0E_ligprep_4H2O_sidechains_optimized_orient_flexx_correct.mol2
  INFO
  ATLIST
END

# Lecture des ligands
FOREACH $(lig_no) INLIBRARY
  ../../Chimiotheque_Curie_AND_actives_DUDE_aces/ICC2013-n10_ligprep_mc-
  csearch_AND_DUDE_actives_aces_title-ok.sdf

  LIGAND
    READ ../../Chimiotheque_Curie_AND_actives_DUDE_aces/ICC2013-n10_ligprep_mc-
    csearch_AND_DUDE_actives_aces_title-ok.sdf $(lig_no) y
  END

# Docking
DOCKING
  selbas a
  placebas 3
  complex all
  optimize all 3 1000 y
  seloutp score_docking a
  info n 0
  seloutp screen
END

LIGAND
  write ligands_10_poses y y 1-10 n
  delete
END

ENDFOR
```

Compound	Total_Score	Crash	Polar
10_000	3.8349	-1.2789	2.1867
10_001	3.7811	-1.4391	2.3166
10_002	3.7786	-0.9318	0.9578
10_003	3.7008	-0.4869	0.0017
10_004	3.6554	-0.9193	2.1165
10_005	3.5466	-0.5654	0.0000
10_006	3.5426	-0.4481	1.3565
10_007	3.5425	-0.8993	0.0000
10_008	3.5422	-0.8762	2.1556
10_009	3.5353	-0.4404	0.0003
10_010	3.5254	-0.4596	0.0075
10_011	3.5080	-0.4262	0.0033
10_012	3.4780	-0.7691	2.1462
10_013	3.4772	-0.5949	0.8197
10_014	3.4048	-3.3805	2.0414
10_015	3.3726	-0.7646	0.0212
10_016	3.3456	-0.4697	0.0000
10_017	3.2824	-0.4823	1.0016
10_018	3.1663	-0.8722	0.0679
10_019	3.0706	-0.4337	0.0010

Annexe 5. Extrait du fichier *output* résultant du criblage virtuel par Surfex avant traitement informatique. Dans cette partie, les 20 poses du composé 10 sont représentées par 3 valeurs dont la première correspond au score qui nous intéresse ici.

#score	compound
15.7751	16174
15.2990	CHEMBL1087459-4
15.2865	CHEMBL589978-2
15.2766	CHEMBL410915
15.1983	CHEMBL489454-2
15.0882	CHEMBL410915-3
15.0488	CHEMBL413243
15.0365	CHEMBL589978
14.9509	CHEMBL445454-2
14.9504	CHEMBL406885-2
14.9179	CHEMBL1173761
14.7658	CHEMBL406885
14.7154	CHEMBL406645
14.6861	CHEMBL267591
14.6809	CHEMBL259523-3
14.6451	14714
14.6279	CHEMBL406885-3
14.6258	CHEMBL484705-29
14.5730	14369

Annexe 6. Extrait du fichier obtenu après traitement informatique du fichier *output* résultant du criblage virtuel par Surfex. Dans ce fichier, les molécules de la chimiothèque avec leur code (deuxièmes colonne) sont classées en fonction de leur score par ordre décroissant (premières colonne).

compound	glide_score	Surflex_score	gold_score
1	-6.97	-5.3491	-94.05
2	-10.02	-9.3486	-131.84
3	-7.4	-6.089	-95.3
3-2	-6	-5.05	-95.85
4	-6.71	-5.0467	-98.28
5	-9.55	-10.9649	-130.22
5-2	-9.2	-10.4667	-133.24
6	-9.29	-7.0134	-99.76
6-2	-9.11	-6.7384	-109.98
7	-7.4	-7.6166	-105.67
7-2	-8.68	-6.8969	-113.03
8	-4.49	-5.8576	-96.49
9	-7.16	-5.1105	-88.06
10	-6.6	-4.9639	-88.41
11	-7.94	-5.8218	-95.27
12	-7.5	-6.8075	-119.1
13	-7.32	-8.1215	-120.05
14	-8.64	-4.7681	-111.44
15	-5.92	-8.443	-102.72

Annexe 7. Extrait du fichier *input* de lancement de vSDC.

#classement	Score_vSDC	Compound	Glide	Surflex	Gold
1	2.382	CHEMBL410915	-12.270	-15.277	-149.210
2	2.301	CHEMBL406885-2	-12.250	-14.950	-153.970
3	2.275	CHEMBL589978-2	-10.930	-15.287	-136.520
4	2.269	16174	-12.760	-15.775	-136.430
5	2.256	CHEMBL406885	-10.580	-14.766	-158.500
6	2.244	CHEMBL406645	-10.530	-14.715	-149.150
7	2.235	CHEMBL259523-3	-10.630	-14.681	-140.100
8	2.226	14714	-11.590	-14.645	-143.980
9	2.222	CHEMBL406885-3	-10.820	-14.628	-138.440
10	2.222	CHEMBL484705-29	-10.570	-14.626	-145.750
11	2.209	14369	-13.610	-14.573	-139.700
12	2.176	CHEMBL410915-3	-12.770	-15.088	-135.050
13	2.169	CHEMBL484705-25	-9.990	-14.412	-144.520
14	2.141	CHEMBL589978	-9.940	-15.037	-136.580
15	2.138	3553	-10.010	-14.284	-139.280
16	2.138	CHEMBL406645-3	-12.860	-14.285	-137.510
.					
.					
.					
25260	-12.860	6578-3	-7.730	46.807	-92.860

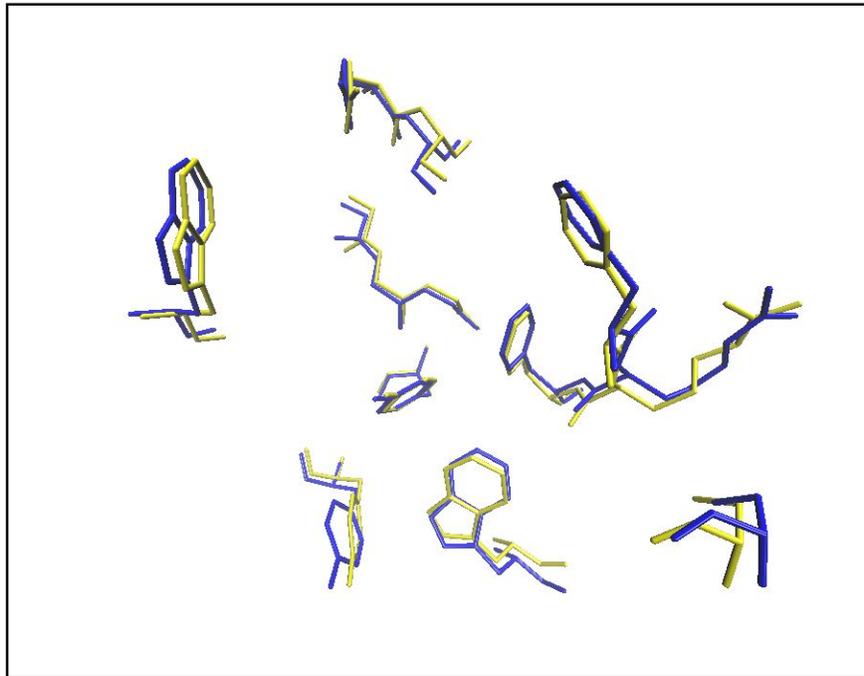
Annexe 8. Extrait du fichier *output* de vSDC tenant compte des tautomères et des molécules actives de la DUD-E. Le nom des molécules actives commence par CHEMBL. Les tautomères issues d'une même molécule sont représentées avec la même couleur.

#classement	Score_vSDC	Compound	Glide	Surflex	Gold
1	2.382	CHEMBL410915	-12.270	-15.277	-149.210
2	2.301	CHEMBL406885-2	-12.250	-14.950	-153.970
3	2.275	CHEMBL589978-2	-10.930	-15.287	-136.520
4	2.269	16174	-12.760	-15.775	-136.430
5	2.244	CHEMBL406645	-10.530	-14.715	-149.150
6	2.235	CHEMBL259523-3	-10.630	-14.681	-140.100
7	2.226	14714	-11.590	-14.645	-143.980
8	2.222	CHEMBL484705-29	-10.570	-14.626	-145.750
9	2.209	14369	-13.610	-14.573	-139.700
10	2.138	3553	-10.010	-14.284	-139.280
.					
.					
.					
14758	-12.860	6578-3	-7.730	46.807	-92.860

Annexe 9. Contenu du fichier *output* de vSDC en présence des molécules actives de la DUD-E. Les six colonnes représentent respectivement : le classement, le score vSDC, le nom de chaque composé (celui des molécules actives commence par CHEMBL), les scores de Glide, Surflex et Gold.

#classement	Score_vSDC	Compound	Glide	Surflex	Gold
1	2.269	16174	-12.760	-15.775	-136.430
2	2.226	14714	-11.590	-14.645	-143.980
3	2.209	14369	-13.610	-14.573	-139.700
4	2.138	3553	-10.010	-14.284	-139.280
.					
.					
.					
14307	-12.860	6578-3	-7.730	46.807	-92.860

Annexe 10. Contenu du fichier vSDC après traitement en absence des molécules actives de la DUD-E. Les tautomères de chaque composé (si existant) ont été éliminés pour ne garder que celui le mieux classé. Ce fichier comporte six colonnes représentant respectivement : le classement, le score vSDC, le nom de chaque composé, le score de Glide, Surflex et Gold.



Annexe 11. Superposition des résidus du site actif de l'AChE humaine en jaune (code pdb : **4M0E**) et ceux de l'espèce *Electrophorus electricus* en bleu (code pdb : **1C2B**).

Résumés

L'acétylcholinestérase (AChE) est actuellement la cible la plus favorable pour le traitement symptomatique et la réduction de la progression de la maladie d'Alzheimer (MA). Dans le présent travail, une nouvelle stratégie de criblage virtuel a été employée pour identifier, parmi les 14307 composés issus de la chimiothèque de l'Institut Curie, de nouveaux inhibiteurs de cette enzyme. Cette stratégie consiste à utiliser plusieurs programmes en criblage virtuel suivi par l'application d'une méthode consensuelle (vSDC) et d'une analyse visuelle méticuleuse dans le but de réduire le nombre de composés faux/positif tout en améliorant le taux de réussite des tests expérimentaux. En effet, 12 hits ont été révélés parmi seulement 14 composés testés *in vitro*, ce qui correspond à un rendement près de 86%. Encore mieux, 6 hits ont présenté expérimentalement un effet inhibiteur nettement meilleur que celui de la galantamine; inhibiteur de référence utilisé. L'évaluation *in silico* des critères physicochimiques, pharmacocinétiques et de toxicité potentielle de ces hits nous a renseigné de manière positive sur leurs propriétés ADMET. Enfin, l'étude *in vivo* de la cytotoxicité menée sur des larves d'*Artemia salina* a montré à travers notamment l'évaluation du rapport CL_{50}/IC_{50} que les six hits possèdent une activité inhibitrice plus importante que leur effet toxique et peuvent donc servir comme structures de départ pour l'optimisation et la conception de nouveaux candidats-médicaments de la MA.

Mots clés : Acétylcholinestérase, Criblage virtuel, Inhibiteur, Maladie d'Alzheimer, vSDC.

Abstract

Acetylcholinesterase (AChE) is currently the most favorable target for the symptomatic treatment and reduction of Alzheimer's disease (AD). In this work, a new structure-based virtual screening strategy was used in order to identify, among 14307 compounds of Institut Curie-CNRS chemical library, new potent AChE inhibitors. The strategy undertaken in this work consisted of the use of several docking programs in SBVS calculations followed by the application of a consensus method (vSDC) and a scrupulous visual analysis. It allowed us to obtain a high degree of success, with a yield of almost 86%, since 12 hits were identified among only 14 molecules tested *in vitro*. Still more remarkably, 6 of these hits were more active than galantamine, the reference inhibitor. These hits were predicted to have good ADMET properties. Finally, the *in vivo* study of cytotoxicity undertaken on *Artemia salina* larvae showed, in particular, through the evaluation of the LC₅₀ / IC₅₀ ratio that the six hits have a greater inhibitory activity than their toxic effect, which can thus be used as starting structures for the optimization and design of new AD drug candidates.

Keywords: Acetylcholinesterase · Alzheimer's disease · inhibitory activity · Virtual screening · vSDC

الملخص

يعتبر أسيتيل كولينيستراز الإنزيم الأكثر استهدافا حاليًا لعلاج أعراض وتقليل تطور مرض الزهايمر. في العمل الحالي ، تم استخدام إستراتيجية جديدة للغريلة الافتراضية لاكتشاف مثبطات جديدة لهذا الإنزيم من بين 14307 جزيئة قادمة من معهد كوري بفرنسا. تتمثل هذه الإستراتيجية في استخدام العديد من البرامج في عملية الغريلة الافتراضية متنوعة بتطبيق طريقة توافقية (vSDC) وتحليل نظري دقيق من أجل تقليل عدد المركبات الخاطئة / الإيجابية مع تحسين معدل نجاح الاختبارات التجريبية. هذه الإستراتيجية سمحت لنا باكتشاف 12 مثبط جديد من بين 14 جزيئة فقط تم اختبارها في تجريبيا أي بمردود يقارب 86%. بالإضافة، 6 من بين هذه المثبطات كانت أكثر فعالية من الجالنتامين، المثبط الشاهد المستخدم. أعطت دراسة الخصائص الفيزيائية والكيميائية لهذه المثبطات مؤشرا إيجابيا على خصائصها التي تسمح لها من ممارسة نشاطها البيولوجي بصفة عادية. أظهرت دراسة السمية الخلوية التي أجريت على يرقات *Artemia salina*، على الخصوص، من خلال تقييم نسبة LC_{50} / IC_{50} أن الست المثبطات تتمتع بنشاط مثبط أكبر من تأثيرها السام و بالتالي يمكننا استخدام هياكل هذه المثبطات من أجل تحسينها وتصميم الأدوية المرشحة الجديدة

الكلمات الرئيسية: أسيتيل كولينيستراز ، مرض الزهايمر ، نشاط مثبط ، فحص افتراضي ، vSDC

Nom : **MOKRANI**
Prénom : **El Hassen**

Date de soutenance : 18-10-2020
Année universitaire : 2019/2020

Intitulé : Identification par criblage virtuel et analyses biologiques de nouveaux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.

L'acétylcholinestérase (AChE) est actuellement la cible la plus favorable pour le traitement symptomatique et la réduction de la progression de la maladie d'Alzheimer (MA). Dans le présent travail, une nouvelle stratégie de criblage virtuel a été employée pour identifier, parmi les 14307 composés issus de la chimiothèque de l'Institut Curie, de nouveaux inhibiteurs de cette enzyme. Cette stratégie consiste à utiliser plusieurs programmes en criblage virtuel suivi par l'application d'une méthode consensuelle (vSDC) et d'une analyse visuelle méticuleuse dans le but de réduire le nombre de composés faux/positif tout en améliorant le taux de réussite des tests expérimentaux. En effet, 12 hits ont été révélés parmi seulement 14 composés testés *in vitro*, ce qui correspond à un rendement près de 86%. Encore mieux, 6 hits ont présenté expérimentalement un effet inhibiteur nettement meilleur que celui de la galantamine ; inhibiteur de référence utilisé. L'évaluation *in silico* des critères physicochimiques, pharmacocinétiques et de toxicité potentielle de ces hits nous a renseigné de manière positive sur leurs propriétés ADMET. Enfin, l'étude *in vivo* de la cytotoxicité menée sur des larves d'*Artemia salina* a montré à travers notamment l'évaluation du rapport CL_{50}/IC_{50} que les six hits possèdent une activité inhibitrice plus importante que leur effet toxique et peuvent donc servir comme structures de départ pour l'optimisation et la conception de nouveaux candidats-médicaments de la MA.

Mots clés : Acétylcholinestérase, Criblage virtuel, Inhibiteur, Maladie d'Alzheimer, vSDC.

Laboratoire de recherche : Biochimie Appliquée.

Président :	CHIKHI A.	Pr. Univ. F. Mentouri /Constantine 1
Encadreur :	BENSEGUENI A.	Pr. Univ. F. Mentouri/ Constantine 1
Examineurs :		
	NEGHRA A.	M.C.A. Univ. Badji Mokhtar/Annaba
	DEMS M.A.E.	M.R.A. CRBt Constantine
	SOBHI W.	M.C.A Univ. Ferhat Abbas /Setif 1